

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## DÉSHYDROGÉNATION DE L'ACIDE $\beta$ -HYDROXYBUTYRIQUE PAR *B. MEGATHERIUM*

par M. LEMOIGNE, C. PÉAUD LENOEL et M. CROSON (\*).

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

L'un de nous a démontré que des bactéries comme *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis* et surtout *B. megatherium*, forment et accumulent dans leurs cellules d'importantes réserves lipidiques qui, par autolyse, donnent de l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique.

Cet acide existe toujours dans les cultures du *B. megatherium* en milieu sucré [1] ainsi que l'acide acétylacétique [2] et l'acétone qui provient de sa décarboxylation spontanée [3]. D'autre part, lors de la sporulation, le lipide diminue brusquement [4], produisant certainement de l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique.

Nous avons recherché ce que devient cet acide sous l'action de *B. megatherium*.

Dans ce mémoire, nous étudions le premier stade de son métabolisme.

★★

En 1909, Wakeman et Dakin [5] décrivent un enzyme préparé du foie qui catalyse l'oxydation de l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique en

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mai 1949.

acide acétylacétique. En 1936, Green et Brosteaux [6] constatent que le muscle contient une  $\beta$ -hydroxybutyrique déshydrogénase et, en 1937, D. E. Green, J. G. Dewan et L. F. Leloir [7] indiquent la préparation d'un complexe enzymatique obtenu du muscle cardiaque du porc qui renferme une déshydrogénase transformant réversiblement l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique en acide acétylacétique. Le coferment de cet enzyme serait le coenzyme I, qui, réduit, peut être oxydé par un autre enzyme contenant sans doute une flavine comme coferment.

Par contre, l'action des bactéries sur l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique a été peu étudiée et les résultats obtenus sont surtout négatifs. Dooren de Jong [8], en 1926, constate que sur 13 bactéries, 4 seulement peuvent se développer, quoique faiblement, dans un milieu dont le seul substrat organique est l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique (*B. prodigiosus*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas fluorescens* et *Spirillum tenue*. *B. megatherium* n'a pas été étudié par cet auteur.

En 1938, Wilhem Franke et Walter Peris [9], utilisant la méthode des bactéries non proliférantes, constatent que sur 15 espèces étudiées, une seule, *B. alcaligenes* oxyde nettement l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique. Pour une respiration endogène de 7 mm<sup>3</sup> d'oxygène pour 1 mg. de microbes secs en une heure ( $q$  O<sub>2</sub>) on trouve une absorption de 44 (Q O<sub>2</sub>) quand on ajoute du  $\beta$ -hydroxybutyrate. Pour *B. fluorescens liquefaciens* et *B. pyocyaneum* les valeurs de  $q$  O<sub>2</sub> sont respectivement de 18 et 12 alors que celles de Q O<sub>2</sub> en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate sont de 27 et 29. Toutes les autres espèces essayées sont sans action sur ce substrat et parmi elles deux souches de *B. megatherium*. Pour ces organismes, les valeurs de  $q$  O<sub>2</sub> sont de 13 et 16, alors que celles de Q O<sub>2</sub> en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate sont de 15 et 16. Dans un nouveau mémoire, W. Franke et A. Schillinger [10] arrivent, en 1944, à des résultats analogues. Ils considèrent que *B. megatherium* présente un type nettement différent des autres bactéries. Ayant une respiration endogène élevée, il oxyde bien les glucides, modérément les acides aminés, mais est absolument incapable d'oxyder les acides gras (lipophobie). Ainsi, alors que  $q$  O<sub>2</sub> est de 14, Q O<sub>2</sub> est respectivement de 14 avec l'acide acétique, 19 avec l'acide propionique, 16 avec l'acide butyrique et de 15 avec l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique.

Nous devons signaler que la technique employée par ces auteurs comporte des lavages avec ClNa à 0,85 p. 100 sans refroidissement et un traitement par l'air comprimé pendant seize heures, pour éliminer autant que possible les substrats préexistants.

Il résulte de ces travaux que *B. megatherium* est, comme la plupart des microbes, incapable d'oxyder l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique.



Etant donné l'importance de cet acide dans le métabolisme des bactéries sporulées à inclusions lipidiques [11], nous avons repris cette question.

#### TECHNIQUES.

Le bacille employé est *B. megatherium* qui, après dessiccation par lyophilisation, est conservé dans le vide à la glacière.

On fait les cultures dans des boîtes de Roux, sur bouillon de haricots, peptoné à 0,2 g. p. 100 et additionné de 2 g. p. 100 de saccharose et 2 g. p. 100 de gélose. Après des temps d'incubation variables à 31°, les corps microbiens sont récoltés sans entraîner de gélose. On les met en suspension dans de l'eau bidistillée ou dans des solutions de ClNa à 0,85 p. 100, stériles. On homogénéise avec des billes de verre stériles. Le liquide est séparé par centrifugation et les microbes sont lavés un nombre variable de fois, avec ou sans refroidissement. Des précisions seront indiquées pour chaque essai. La dilution finale, bien homogène, est analysée pour la détermination de la matière sèche contenue dans 1 cm<sup>3</sup> (on tient compte, s'il y a lieu, du ClNa).

L'absorption d'oxygène et le dégagement d'anhydride carbonique sont déterminés par la méthode de Warburg.

Le glucose utilisé est du glucose R.A.L. purifié au laboratoire.

Le  $\beta$ -hydroxybutyrate employé est soit du *d. l.* obtenu par synthèse, soit du *l.* provenant de la dépolymérisation et de l'hydrolyse du lipide  $\beta$ -hydroxybutyrique du *B. megatherium*. On le prépare par précipitation du sel double de Zn et de Ca qui est décomposé par une quantité calculée de phosphate de sodium. La technique de cette préparation sera exposée d'autre part.

L'acide acétique est recherché par la méthode de Duclaux et l'acide acétylacétique caractérisé et dosé par la méthode de Legal (technique d'Heitzmann [10] et par la formation de la 2-4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétone.

#### TECHNIQUES.

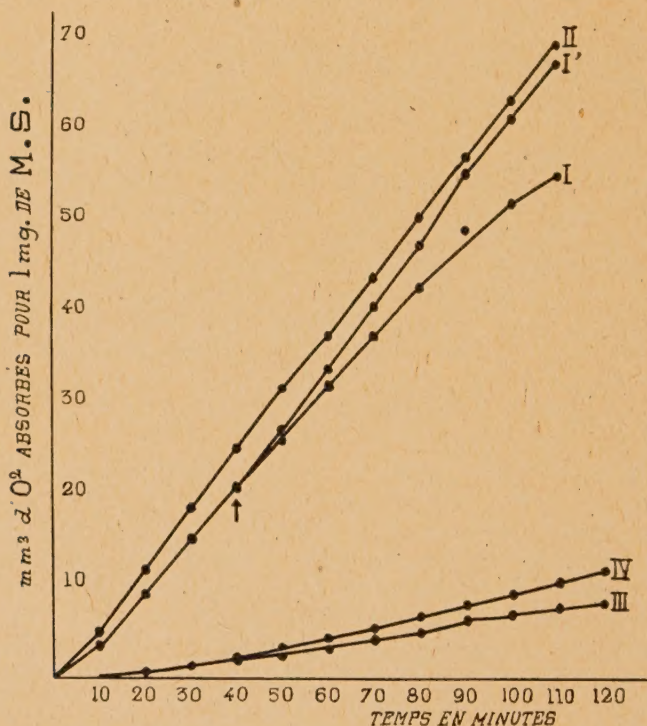
Les essais effectués ont donné des résultats très différents suivant les conditions expérimentales.

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS. — Dans cette première série, les bacilles ne sont pas lavés mais, après la récolte, sont mis directement en suspension dans l'eau bidistillée ou de l'eau physiologique stérile.

Essai n° 3. — Dans cet essai, c'est le glucose qui est employé comme substrat.

Une culture de vingt-quatre heures, sur gélose, est émulsionnée dans de l'eau bidistillée stérile.

Dans chaque cupule de Warburg, on met : 1 cm<sup>3</sup> de phosphate



- I — TÉMOIN SANS GLUCOSE  
 I' — AVEC — APRÈS 40'(t) } 1<sup>re</sup> SÉRIE  
 II — AVEC GLUCOSE DÈS LE DÉBUT } SANS LAVAGE  
 III — TÉMOIN SANS GLUCOSE } 2<sup>e</sup> SÉRIE  
 IV — AVEC GLUCOSE } AVEC LAVAGE  
 SANS REFROIDISSEMENT

Fig. 1

de potassium M/5 à pH 5,6 ; 0,8 cm<sup>3</sup> d'émulsion microbienne contenant 4,4 mg. de matière sèche ; 0,2 cm<sup>3</sup> d'eau bidistillée ou la même quantité de glucose à 5 p. 100. On opère en présence



d'air à la température de 28°5 (on met du KOH dans la tubulure centrale de la cupule).

Les courbes de la figure 1 montrent les résultats : la courbe I montre l'absorption d'oxygène par le témoin et la courbe II par des suspensions contenant du glucose. Les différences sont peu nettes. Mais la courbe I' indique les résultats quand le substrat est ajouté seulement après quarante minutes : on voit les courbes I et I' diverger, mais cette divergence reste faible. La respiration endogène ( $q\text{ O}_2$ ) est de 28 et celle en présence de glucose ( $Q\text{ O}_2$ ) de 38.

Donc ici, quand les bactéries ne sont pas lavées, la respiration endogène masque en partie la respiration due au glucose. Des résultats analogues sont obtenus avec le  $\beta$ -hydroxybutyrate comme substrat.

DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS. — Dans cette série les lavages sont répétés au moins à trois reprises pour éliminer les métabolites, mais sans refroidissement. Les résultats obtenus avec le glucose donnent les courbes IV et V de la figure I. La respiration endogène est très faible ( $q\text{ O}_2 = 4,9$ ) mais l'absorption d'oxygène augmente peu en présence de glucose ( $Q\text{ O}_2 = 7,5$ ).

Il en est de même avec l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique comme substrat.

*Essai 86.* — Culture de trente heures. Les corps microbiens sont lavés trois fois dans ClNa à 0,85 p. 100. Les liquides de lavage ne sont pas refroidis, mais on agite pendant trente minutes, dans de la glace fondante.

Les autres conditions expérimentales sont les mêmes que celles qui seront indiquées dans l'essai 82.

Les résultats sont donnés par la courbe I de la figure 2.

Le  $\beta$ -hydroxybutyrate est ajouté après une heure quinze. La courbe d'absorption d'oxygène se relève, mais très peu.

$q\text{ O}_2$  est de 2,65 alors que  $Q\text{ O}_2$  est de 7,3.

On hésite donc à conclure à l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate.

TROISIÈME SÉRIE D'ESSAIS. — Dans cette série la technique est presque la même que celle de l'essai 86. Cependant on opère avec des liquides de lavage bien refroidis. La respiration endogène est moins abaissée que dans les essais de la série 2.

Nous ne citerons qu'un seul exemple :

*Essai 82.* — La culture de trente heures est lavée trois fois dans du ClNa à 0,85 p. 100. Les tubes, pendant l'agitation qui dure vingt minutes, étant dans la glace fondante.

Dans chaque cupule de Warburg, on met 1 cm<sup>3</sup> de phosphate de K M/15 à pH 7,2, 1 cm<sup>3</sup> d'émulsion microbienne contenant

21,9 mg. de bacilles secs. Dans la tubulure latérale on met  $0,4 \text{ cm}^3$  d'eau ou  $0,4 \text{ cm}^3$  d'une solution de  $\beta$ -hydroxybutyrate de sodium 0,6 M. On opère à  $30^\circ$  sous oxygène. La moitié des cupules contiennent de la potasse dans la tubulure centrale. Les autres reçoivent la même quantité d'eau bidistillée. Au bout d'une

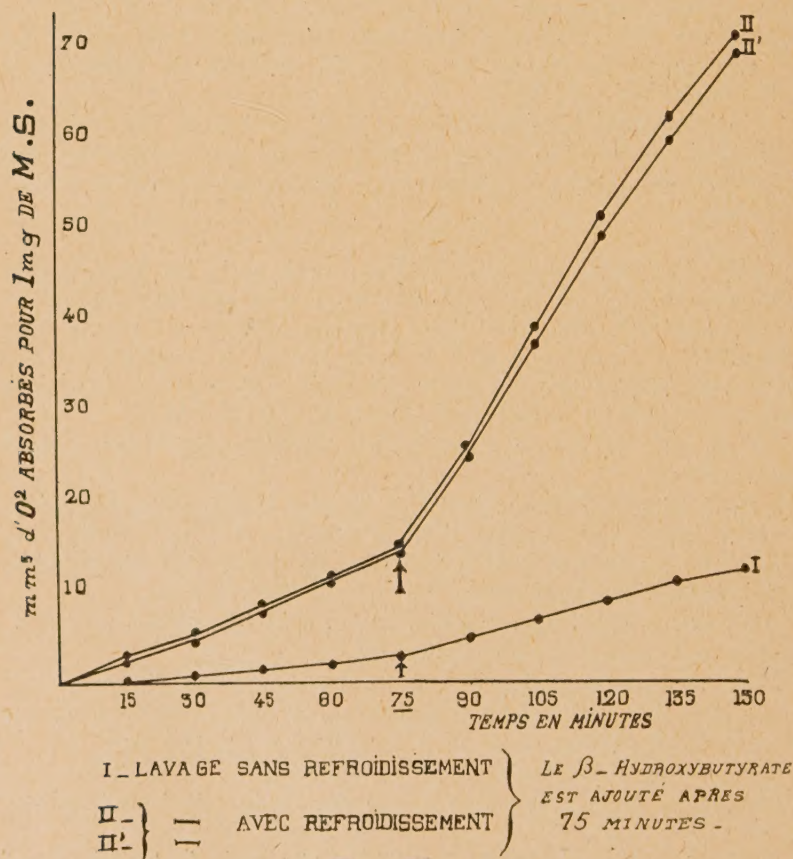


Fig. II

heure quinze, on verse le  $\beta$ -hydroxybutyrate dans la cupule de Warburg.

Les résultats sont indiqués par les courbes de la figure 2 (II et II'). L'expérience a été faite en double et les absorptions obtenues dans les deux cas sont analogues.

On voit réellement que l'addition de  $\beta$ -hydroxybutyrate de Na augmente l'absorption d'oxygène.



$q$  O<sub>2</sub> était de 12,5 et  $Q$  O<sub>2</sub> en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate atteint 44,3.

Voici les résultats de quatre essais analogues :

**Millimètres cubes d'oxygène absorbés en une heure  
pour 1 mg. de bacilles secs.**

Sans substrat ( $q$ O <sub>2</sub> ) . . . . .	9,2	11,3	9,3	10,3
Avec $\beta$ -hydroxybutyrate ( $Q$ O <sub>2</sub> ) . . . . .	19,0	22,0	22,0	22,5

Bien que moins accusés que les résultats de l'essai 82, ces chiffres indiquent cependant nettement que l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique a été métabolisé.

Dans ces essais nous avons également déterminé les quantités de CO<sub>2</sub> dégagées.

Les résultats qui indiquent les mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> dégagés pendant une heure pour 1 mg. de bacilles secs sont indiqués ci-dessous :

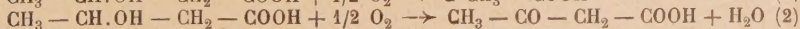
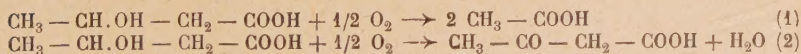
	NUMÉROS DES ESSAIS			
	96	90	82	136
Sans substat. . . . .	6,2	10,1	8,6	6,4
Avec $\beta$ -hydroxybutyrate . . . . .	10	9,3	8,9	6,6

Ces chiffres montrent que l'absorption d'oxygène n'est pas accompagnée de dégagement de CO<sub>2</sub>.

On peut conclure de ces expériences que l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique est métabolisé par le *B. megatherium* mais que le mécanisme qui permet cette oxydation est fragile et peut parfaitement être détruit lors de la préparation des émulsions microbiennes. Ceci explique les quelques résultats négatifs que nous avons obtenus et sans doute, aussi, ceux qui sont signalés par Franke, qui opérait avec des bacilles sûrement déjà autolysés.

**PRODUITS DE L'OXYDATION DU  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE.**

Le fait que cette oxydation se produit sans formation simultanée de CO<sub>2</sub> conduit à admettre une des deux formules suivantes pour l'oxydation de l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique :



Même en opérant sur des quantités relativement grandes d'émulsion microbienne et d'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique, il nous a été impossible de mettre en évidence la formation d'acide acétique. Donc la formule (1) ou toute autre formule aboutissant à la formation d'acide acétique est à écarter dans ce cas.

Par contre, il nous a été facile de caractériser et de doser l'acide acétylacétique :

25 cm<sup>3</sup> d'émulsion contenant 12,2 mg. de bacilles secs par centimètre cube sont mélangés à 25 cm<sup>3</sup> de phosphate de K M/15 à pH 7,2.

On ajoute 1,328 g. de *L*- $\beta$ -hydroxybutyrate de sodium.

Un essai témoin ne contient pas de  $\beta$ -hydroxybutyrate.

On agite les émulsions dans l'air pendant trois heures à 31°.

La déviation polarimétrique pour une longueur de 2 décimètres passe de  $-0^{\circ}30$  au temps zéro à  $-0^{\circ}27$  après une heure trente et  $-0^{\circ}23$  après trois heures. La réaction de Legal est très nettement positive et sa cinétique correspond à celle de l'acide acétylacétique (maximum de coloration de neuf à douze minutes).

Au début, par centimètre cube, il y avait 27  $\gamma$  d'acide acétylacétique. Après trois heures, dans les témoins on trouve 45 et 13  $\gamma$ , alors que dans l'échantillon contenant le *L*- $\beta$ -hydroxybutyrate, il y en a 2.280  $\gamma$  après une heure trente et 2.730 après trois heures.

Pour vérifier que la réaction de Legal observée est bien due à l'acide acétylacétique, on prépare la 2-4-dinitrophénylhydrazone de l'acétone. 100 cm<sup>3</sup> d'émulsion microbienne contenant au début l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique sont incubés trois heures à 31°, puis trois heures à la glacière vers 0°. On distille après avoir acidifié avec l'acide phosphorique. Le distillat donne avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine un précipité abondant. Son aspect microscopique et surtout son point de fusion mixte (123°) permettent de l'identifier avec la 2-4-dinitrophénylhydrazone de l'acétone.

Cette réaction n'a pas été faite quantitativement. Mais pour montrer qu'elle était intense, nous signalons que nous avons recueilli 0,475 g. de cette hydrazone correspondant à 0,328 g. d'acide acétylacétique.

Une émulsion identique, sans incubation en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate, donne un distillat qui ne trouble pas la 2-4-dinitrophénylhydrazine.

En adoptant la formule 2, d'après laquelle un atome d'oxygène correspond à une molécule d'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique et à une molécule d'acide acétylacétique, on peut calculer que la quantité d'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique déshydrogéné dans l'essai 82 est, pour 21,9 mg. de bacilles secs, de 36 p. 100 si l'on ne tient pas compte de la respiration endogène et de 26 p. 100 si l'on défalque celle-ci.

#### CONCLUSIONS.

Contrairement à ce qu'ont observé Franke et Peris et Franke et Schillinger, les bactéries non proliférantes obtenues à partir d'une souche de *B. megatherium* oxydent l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique.



Mais le système enzymatique qui provoque cette transformation est assez fragile pour que des lavages, faits sans précautions, l'inactivent presque complètement.

L'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique est en fait déshydrogéné en acide acétylacétique, comme cela se produit dans les tissus des animaux supérieurs.

Par la technique des bactéries non proliférantes, on s'arrête à ce stade de dégradation.

Il nous reste à rechercher ce que devient l'acide acétylacétique dans les conditions normales de développement.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEMOIGNE (M.). *Helvetica chimica acta*, 1946, **29**, 1304.
- [2] HEITZMANN (P.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 87.
- [3] LEMOIGNE (M.). *Ces Annales*, 1927, **41**, 148.
- [4] LEMOIGNE (M.) et ROUKHELMAN (N.). *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **241**, 673 ; *Ann. Ferment.*, 1940, **5**, 527.
- [5] WAKEMAN et DAKIN. *J. Biol. Chem.*, 1909, **6**, 373.
- [6] GREEN et BROSTEAUX. *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1489.
- [7] GREEN (D. E.), DEWAN (J. G.) et LELOIR (L. F.). *Biochem. J.*, 1937, **31**, 934.
- [8] DOOREN DE JONG, cité par STEPHENSON. *Bact. Metabolism*, London, 2<sup>e</sup> édit., 1939, 193.
- [9] FRANKE (Wilhem) et PERIS (Walter). *Biochem. Z.*, 1938, **295**, 61.
- [10] FRANKE (Wilhem) et SCHILLINGER (Annelies). *Biochem. Z.*, 1944, **316**, 313.
- [11] LEMOIGNE (M.), DELAPORTE (B.) et CROSON (M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 224.

# ÉTUDES SUR LE COLLAGÈNE

## II. — NOUVELLES RECHERCHES SUR LES COLLAGÉNASES BACTÉRIENNES

par MARCELLE DELAUNAY, MAYLIS GUILLAUMIE et ALBERT DELAUNAY (\*).

(Institut Pasteur.)

I. — Depuis huit mois, nous avons eu l'occasion de mettre maintes fois en œuvre notre méthode personnelle de recherche des collagénases [1]. Elle a continué de nous donner toute satisfaction. En Angleterre, les D<sup>rs</sup> C. L. Oakley et E. Bidwell font déjà, eux aussi, un large usage du collagène A qu'ils considèrent comme un collagène non dégradé [2]. D'après E. Bidwell, le pH optimum pour la lyse collagénasique du collagène A serait compris entre 6,0 et 6,5 [2]. Précisons ici que nos pastilles de collagène se dissolvent spontanément dans un milieu dont le pH est de 4.

Nous avons renoncé à conserver — avant emploi — nos pastilles de collagène A dans l'éther, car ce liquide tend à les dénaturer. En effet, après deux mois de séjour dans l'éther, elles sont lysées plus lentement qu'aussitôt après leur préparation : leur destruction totale, par exemple, se produit en sept jours au lieu de trois ; cette destruction, d'autre part, peut rester partielle, alors qu'elle serait complète avec une pastille fraîchement préparée. Désormais, nous nous bornons à conserver ces pastilles à l'état sec et à l'abri de la poussière.

II. — A l'aide de notre méthode personnelle de détection, nous avons recherché la présence d'une collagénase dans différents filtrats de *Clostridium perfringens*, de *Clostridium histolyticum*, de *Clostridium sporogenes* et de germes saprophytes divers.

### FILTRATS DE *Clostridium perfringens*.

1° TYPE A (Syn. *Welchia perfringens*). — Nous avons examiné les filtrats de culture de 4 souches différentes : S.S., Lechien, Am 8 et Mayer. Les cultures, faites en milieu Vf additionné de 1/1.000 de glucose et de 1,5 p. 1.000 de sang desséché, ont été

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1949.



filtrées sur bougie L 2 ou L 3 après quatorze heures d'étuve à 32°. Les filtrats toxiques ont été utilisés plus ou moins dilués en eau physiologique.

Les résultats que nous avons obtenus, en étudiant dans cette nouvelle série d'expériences les filtrats *S.S.* et *Lechien*, ont confirmé tout à fait ceux que nous avons publiés antérieurement [4].

*Résultats.* — a) Le filtrat liquide *S.S.*, très riche en lécithinase, est riche en collagénase (dilué cent fois en eau physiologique, il lyse totalement les pastilles de collagène A en cinq jours; lyse complète en vingt-quatre heures pour le produit originel et la dilution au 1/10).

b) Le filtrat liquide *Lechien*, riche en lécithinase, est très riche en collagénase (une dilution au 1/100 exerce une action lytique totale en trois jours; une dilution au 1/1.000 donne une lyse partielle dans le même temps. Lyse complète en vingt-quatre heures pour le produit originel et la dilution au 1/10).

c) Les filtrats liquides *Am 8* et *Mayer*, pauvres en lécithinase, sont aussi relativement pauvres en collagénase (la dilution au 1/100 demeure sans action).

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent : 1° que les filtrats de culture de *Cl. perfringens* du type A ont une teneur en collagénase variable avec la souche utilisée, mais souvent forte; 2° qu'il n'existe pas de rapport étroit, pour un même filtrat, entre sa richesse en lécithinase et celle en collagénase.

Nous avons, par ailleurs, confirmé, au moyen de notre méthode, le pouvoir collagénasique d'une toxine purifiée de *Clostridium perfringens* du type A que nous avait obligeamment fournie M<sup>lle</sup> E. Bidwell (1). La préparation desséchée (étiquetée B 507 H) avait, d'après les mesures anglaises, la valeur suivante :

28 unités Q par milligramme.

Dose-Test K vis-à-vis de 2 unités anti-K (en présence de muscle) : 0,05 mg.

Dose-Test K vis-à-vis de 2 unités anti-K (en présence d'azocoll) : 0,02 mg.

Nous l'avons reprise par de l'eau physiologique (pH 7) à raison de 1 mg. de poudre par centimètre cube. Cette solution, diluée au 1/2.000, était encore capable de détruire totalement les pastilles de collagène A en huit jours (lyse totale du collagène en vingt-quatre heures dans la solution originelle ou diluée au 1/10 et au 1/100).

2° TYPE B. — Examen de deux toxines desséchées après précipitation (2), la première (B) ayant été préparée en 1935, la

(1) Nous tenons à lui exprimer ici nos plus sincères remerciements.

seconde (B 1) en 1948. Dissolution extemporanée dans de l'eau physiologique à pH 7,2 (2 mg. par centimètre cube).

*Résultats.* — Activité collagénasique nulle.

3° TYPE C. — Examen d'une toxine préparée en 1935, précipitée par le sulfate neutre d'ammonium et conservée depuis lors à l'état sec (2). Dissolution extemporanée dans de l'eau physiologique à pH 7,2 (2 mg. par centimètre cube).

*Résultats.* — Lyse totale des pastilles de collagène dans la solution originelle en trois jours ; lyse seulement partielle dans une dilution au 1/10 au bout de sept jours.

4° TYPE D. — Examen de 3 toxines préparées avec 3 souches différentes. La première (Ov) avait été obtenue en 1935, la seconde (Dp 1) en 1946, la troisième (D 5) en 1947. Toutes avaient été précipitées puis conservées à l'état sec (2). Dissolution extemporanée dans de l'eau physiologique : pH 7,2 (2 mg. par centimètre cube).

*Résultats.* — Toxines Ov et D 5 : lyse totale des pastilles de collagène A dans la solution originelle en quarante-huit heures, dans une dilution au 1/10 en six jours ; lyse partielle dans la dilution au 1/100 en sept jours.

Toxine Dp 1 : lyse partielle du collagène dans la solution originelle au bout de six jours.

5° TYPE E. — Examen de 2 toxines, fournies par la filtration de 2 cultures à 37°, âgées de vingt-deux heures, en bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000.

*Résultats.* — Lyse totale du papier au collagène, pour la solution originelle et pour une dilution au 1/10 en quatre jours. Lyse partielle pour la dilution au 1/100 au bout de six jours.

6° TYPE F. — Examen de 3 toxines liquides fournies par la filtration de 3 cultures à 37°, âgées de vingt-deux heures, en bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000. Elles contenaient 400 doses mortelles par centimètre cube d'après les titrages sur souris (injection intraveineuse). La nocivité de ces toxines était inhibée par les sérums anti-*perfringens* B.

*Résultats.* — Les 3 toxines ne manifestent aucune activité collagénasique.

(2) Les toxines de *Clostridium perfringens* des types B, C et D que nous avons utilisées avaient été desséchées après précipitation par le sulfate neutre d'ammonium. Elles provenaient de cultures maintenues à 37° pendant vingt à vingt-deux heures dans un milieu Vf glucosé à 1/1.000.



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1° Les filtrats des cultures de *Cl. perfringens* types A, C, D et E exercent *in vitro* une activité collagénasique indiscutable (fait déjà remarqué en Angleterre par C. L. Oakley et ses collaborateurs en utilisant le procédé au « papier de collagène »). Indiquons, en outre, que cette activité, déterminée avec le collagène A, est inégalement marquée selon les souches, notamment pour les souches du type D. Cette action *in vitro* rappelle ce qu'on observe *in vivo*, les cultures de *Cl. perfringens* A et C produisant régulièrement une myolyse intense, alors que le pouvoir myolytique des cultures préparées avec différentes souches de *Cl. perfringens* D est passible d'assez larges variations.

2° Nos toxines précipitées C et D ayant conservé une action collagénasique importante, on peut admettre que les collagénases supportent parfaitement la dessiccation (après précipitation) et le vieillissement. Dans le même ordre d'idée, ajoutons que des toxines A liquides conservées quatre mois à la glacière (+4°) n'ont presque rien perdu de leur puissance collagénasique.

3° Les cultures de *Cl. perfringens* B et F ne paraissent pas renfermer de collagénase active *in vitro* sur le collagène A (de même elles n'exercent pas d'action myolytique *in vivo*).

Il nous paraît intéressant de mentionner ici que, d'après nos observations personnelles, le type F élabore sensiblement les mêmes antigènes qu'une de nos souches B conservée depuis quinze ans après de nombreux repiquages en bouillon Vf.

FILTRATS DE *Clostridium histolyticum*.

Examen d'un filtrat frais, préparé le 15 décembre 1948 (Souche Letivi. Milieu de culture : Vf à pH 7,5, non glucosé, non additionné de sang. Temps de culture : vingt-deux heures à 37°). Examen du filtrat brut ou dilué en eau physiologique.

Résultats. — Le filtrat brut a lysé totalement nos pastilles de collagène A en cinq heures.

Le filtrat dilué au 1/10 a lysé totalement les pastilles en vingt-quatre heures. Même action du filtrat dilué au 1/100 en cinq jours. Le filtrat dilué 1.000 fois enfin n'avait détruit le collagène que partiellement au bout de cinq jours.

CONCLUSIONS. — Comme *Clostridium perfringens* type A, *Cl. histolyticum* est capable d'élaborer de grandes quantités de collagénase. Récemment, Jennison a remarqué lui aussi cette activité collagénasique des filtrats de *Clostridium histolyticum*. Voici près de vingt ans, M. Weinberg et A. Randin [3] avaient constaté déjà que ces filtrats attaquent le tendon d'Achille cru de cheval.

CULTURES CENTRIFUGÉES DE *Clostridium sporogenes*.

Une souche est ensemencée dans du bouillon Vf non glucosé, ajusté à pH 7,6. Les cultures sont centrifugées après vingt-quatre et quarante-huit heures d'étuve à 37°, puis filtrées sur bougie L<sub>2</sub>. Les filtrats liquéfient la gélatine, ils ne lysent pas les pastilles de collagène.

Rappelons ici que les filtrats des cultures *perfringens* et histolytique sont toxiques, que nos filtrats de cultures *sporogenes* ne le sont pas.

## FILTRATS DE GERMES SAPROPHYTES DIVERS.

Ce travail, poursuivi dans l'espoir de découvrir des germes donnant des extraits riches en collagénase mais pauvres en autres produits toxiques (comme les lécithinases ou une hémolysine) a échoué.

Nous avons ensemencé sur bouillon ordinaire de nombreux germes de l'air (air du laboratoire) isolés sur gélose. Au bout de vingt-quatre ou de quarante-huit heures d'étuve à 37°, le milieu de culture était filtré et le filtrat étudié, par notre méthode, quant à son pouvoir collagénasique. Résultats régulièrement négatifs. Aucun de nos filtrats n'a provoqué la lyse des pastilles de collagène A.

Dans l'état actuel de nos connaissances, on doit donc admettre que les germes anaérobies dont il a été question plus haut représentent les sources les plus riches de collagénases.

## III. — ACTION NEUTRALISANTE DES ANTISÉRUMS.

Nous avons montré antérieurement que des sérums anti-*perfringens* A, préparés chez le cheval au moyen de cultures centrifugées de *Cl. perfringens* du type A, neutralisent parfaitement la collagénase contenue dans les filtrats de culture de ces germes [4]. Des expériences récentes nous ont appris qu'ils sont en revanche incapables de neutraliser la collagénase produite par *Clostridium histolyticum*. La réciproque, d'ailleurs, comme l'indique le tableau suivant, est vraie.

La toxine *perfringens* mise en œuvre pour ces expériences renfermait par centimètre cube : 30 à 40 doses mortelles (pour la souris), la toxine histolytique : 150 doses mortelles. Notre sérum anti-*perfringens* titrait de 300 à 400 unités anti- $\alpha$  par centimètre cube, notre sérum anti-histolytique 250 à 300 unités anti-histolytiques par centimètre cube.

D'après ces faits, on doit conclure qu'il n'y a pas une collagé-



**Pouvoir anti-collagénasique de différents immunsérums  
(démonstré par notre méthode personnelle).**

NUMÉRO des tubes	CONTENU DES TUBES	INTENSITÉ DE LA LYE des pastilles de collagène au bout de 48 heures à 38° (0, lyse nulle ++++, lyse totale)
1	2 cm <sup>3</sup> de toxine <i>perfringens</i> A + 2 cm <sup>3</sup> de sérum anti- <i>perfringens</i> A dilué au 1/100.	0
2	2 cm <sup>3</sup> de toxine <i>perfringens</i> A + 2 cm <sup>3</sup> de sérum anti-perfringentique dilué au 1/100.	++++
3	2 cm <sup>3</sup> de toxine histolytique + 2 cm <sup>3</sup> de sérum anti- <i>perfringens</i> dilué au 1/100.	++++
4	2 cm <sup>3</sup> de toxine histolytique + 2 cm <sup>3</sup> de sérum anti-histolytique dilué au 1/100.	0

nase mais *des* collagénases, variables d'un genre bactérien à l'autre.

De même on a déjà pu distinguer des hyaluronidases, des gélatinases bactériennes [4]...

#### IV. — SUR L'ACTION DE LA FIBRINOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUE.

D'après J. Nageotte et L. Guyon [5], le collagène serait une substance étroitement apparentée à la fibrine. Très fréquemment — en particulier au cours de la cicatrisation des plaies aseptiques — il se produirait, d'après ces auteurs, un « métamorphisme de la trame fibrineuse provisoire en trame collagène définitive », « la molécule de fibrine deviendrait une molécule de collagène ». Cette conception n'est pas universellement admise. En tout cas, elle ne se trouve pas démontrée par nos recherches personnelles puisque des pastilles de collagène A, déposées dans des solutions de fibrinolyse staphylococcique active (3), n'ont *subi aucune attaque*. Ceci indique à nos yeux que le collagène et la fibrine sont deux substances distinctes.

Sinon, il faut reconnaître que notre méthode de recherche des

(3) Ces solutions nous avaient été remises par notre collègue P. Mercier que nous remercions ici.

collagénases possède un degré de spécificité extraordinairement marqué.

#### V. — LES COLLAGÉNASES SONT-ELLES DES FACTEURS DE DIFFUSION ?

A l'heure actuelle on est parvenu à préciser la nature chimique d'un certain nombre des facteurs de diffusion de Duran-Reynals. Ce sont des hyaluronidases. Néanmoins, certaines substances qui augmentent elles aussi la perméabilité tissulaire n'hydrolysent pas *in vitro* l'acide hyaluronique. Il y a donc des facteurs de diffusion qui ne sont pas des hyaluronidases. Nous nous sommes demandé si les collagénases ne méritaient pas d'être rangées dans ce groupe.

Nous avons fait, à ce sujet, les expériences suivantes.

Des cobayes ont reçu, par voie sous-cutanée, et sous le volume de  $1/2 \text{ cm}^3$  :

Soit un filtrat de culture de *Cl. histolyticum* (4) [pur ou dilué au 1/10, 1/100, 1/1.000 et 1/10.000 en eau physiologique].

Soit une solution aqueuse de la collagénase purifiée que nous avait adressée M<sup>lle</sup> E. Bidwell [pure (1 mg. par centimètre cube) ou diluée au 1/10, 1/100, 1/1.000 et 1/10.000].

Chacune de ces préparations renfermait en suspension une quantité sensiblement égale de granules d'encre de Chine.

Comme injections témoins, nous nous sommes servis d'extrait testiculaire de cobaye auquel avait été mélangée, dans les proportions précédentes, de l'encre de Chine.

Puis nous avons observé les phénomènes locaux secondaires à chaque injection au bout de deux heures et de cinq heures.

#### RÉSULTATS.

a) En tous cas (10 cobayes) l'extrait testiculaire a favorisé la dissémination du colorant (large surface cutanée colorée en noir).

b) L'encre de Chine introduite en mélange soit avec la toxine histolytique soit avec la collagénase *perfringens* purifiée est, au contraire, restée étroitement fixée aux points d'injection (20 cobayes). Elle n'a subi aucune dissémination appréciable, même lorsque les produits injectés avaient provoqué une véritable fonte du collagène local.

*Les collagénases ne sont donc pas des facteurs de diffusion.*

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs, au moyen de leur méthode personnelle de recherche des collagénases, ont étudié le pouvoir collagénasique :

(4) On admet généralement que *Clostridium histolyticum* ne produit pas d'hyaluronidase.



des toxines de *Clostridium perfringens* (types A, B, C, D, E et F) et de *Clostridium histolyticum* ; des cultures filtrées de *Clostridium sporogenes* et de nombreux filtrats de cultures de germes saprophytes.

Ils ont montré en outre que la fibrinolysine staphylococcique demeurerait sans action sur le collagène A, que la collagénase élaborée par *Welchia perfringens* est spécifiquement distincte de celle produite par *Clostridium histolyticum*, qu'il y a donc des collagénases.

Enfin, il ressort de leurs travaux que les collagénases ne sont pas des facteurs de diffusion, comme le sont les hyaluronidases.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ces *Annales*, 1949, **76**, 16.
- [2] Communication personnelle.
- [3] *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 27 ; 1932, **110**, 352.
- [4] *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 434, 452, 479, 783.
- [5] *Arch. Biol.*, 1930, **41**, 1.

**ÉTUDE DU MODE DE MULTIPLICATION  
DU BACILLE  
TUBERCULEUX AVIAIRE (*MYCOBACTERIUM AVIUM*)  
DANS LE MILIEU DE CULTURE DE DUBOS**

**I. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES**

par J. BRETEY et M<sup>me</sup> S. IMELIK (\*).

(*Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.*)

On a toujours essayé de faire cadrer dans un cycle évolutif les différentes formes du bacille tuberculeux : filamenteuses, coccoides, cyanophiles, qu'on peut voir dans certaines cultures à différents stades de leur croissance. Le milieu à l'albumine de bœuf et au Tween, récemment décrit par Dubos, et dans lequel les mycobactéries poussent sous forme relativement homogène se prête bien à une telle étude.

Nous avons, dans ce travail, suivi l'évolution morphologique du bacille aviaire (Souche n° 80 de la Collection du Service de la Tuberculose de l'Institut Pasteur).

**MÉTHODE.** — Les observations ont été faites sur des préparations colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen, en utilisant une technique fixe caractérisée par un temps de coloration à chaud de trois minutes, et des décolorations de trente secondes pour l'acide nitrique au quart et pour l'alcool.

L'ensemencement a été fait à partir d'une culture déjà âgée de quinze jours sur milieu de Löwenstein. On pouvait admettre que la majorité des germes était arrivée à l'âge adulte.

Les observations suivantes ont été faites sur des cultures non agitées, ensemencées avec 1/1.000 de milligramme, les prélèvements ont été faits au fond des tubes.

**OBSERVATION I** (vingt-quatre heures après l'ensemencement). — La préparation faite à partir d'une culture encore en période de latence montre des bacilles isolés ou groupés en amas qui ont habituellement une disposition comparable à celle du bacille diphtérique. Les bâtonnets sont colorés en rouge intense avec deux

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1949.



ou trois nodules plus foncés, paraissant même noirs et disposés soit dans leur corps, soit aux deux extrémités du bacille (fig. 1).

OBSERVATION II (trente-six heures après l'ensemencement). — Il y a des bâtonnets semblables à ceux de la première observation, mais la plupart d'entre eux apparaissent sous une forme allongée et légèrement curviligne. Ils sont plus ou moins rouge foncé avec de nombreux (3, 4, 5) granules à l'intérieur, très intensément colorés, noirâtres. Dans les amas vus à la première observation, les éléments ont pris cet aspect. La configuration des amas est donc conservée et elle dépend de la position initiale des unités bacillaires dans la culture ensemencée (fig. 2).



FIG. 1.

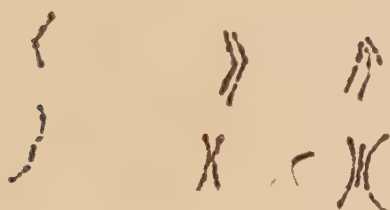


FIG. 2.

OBSERVATION III (quarante-huit heures après l'ensemencement).

— La préparation comprend :

1° Des microbes incurvés, allongés, analogues à ceux de la seconde observation ;

2° Des bâtonnets isolés ou en amas. Leur allongement s'est accru et ils sont sur le point de se diviser en deux, ou, s'ils l'ont déjà fait, chaque moitié tend à se diviser elle-même en deux : la multiplication se fait donc suivant un ordre géométrique.

3° Des unités bacillaires qui ont déjà atteint la longueur de 4 éléments disposés en 2 paires et dont chacune est prête à donner naissance à un nombre égal d'unités, c'est-à-dire à un total de 8 bâtonnets (fig. 3).

OBSERVATION IV (soixante heures après l'ensemencement). — L'allongement des chaînes a continué. Au lieu de chaînes formées de 4 individus, on observe de longs filaments contenant 8 éléments reliés bout à bout. Un tel filament offre une configuration régulière, dont les extrémités sont légèrement incurvées. On observe

tantôt une incurvation plus marquée au milieu du filament, tantôt une inflexion anguleuse, au même niveau.

La taille des bacilles et leur affinité pour le colorant varient suivant qu'ils sont au milieu ou aux extrémités des filaments. En effet, leur volume et leur teinte vont en décroissant à partir du milieu du filament jusqu'aux extrémités. Les éléments centraux sont rouge foncé et leur structure en bâtonnets est nettement



FIG. 3.



FIG. 4.

visible. Les extrémités libres du filament sont roses ou presque incolores et se résolvent en très fines particules roses.

Il est assez rare de rencontrer des filaments complets isolés ayant bien conservé les rapports de leurs divers éléments. On les trouve habituellement soit groupés, et provenant donc des amas bacillaires apportés à l'ensemencement, soit plus souvent en fragments détachés ou brisés par cassure au niveau du point médian du filament que nous avons indiqué comme étant la partie qui présente soit la plus forte courbure, soit l'angulation caractéristique (fig. 4).



OBSERVATION V (soixante-douze heures après l'ensemencement). — A ce stade, la division bacillaire s'effectue à l'intérieur des chaînes de plus en plus longues qui décrivent des arcs plus ou moins ouverts. Les éléments voisins des filaments analogues viennent s'insérer et s'accoler les uns aux autres pour donner les figures en torsades ou en écheveaux. L'ensemble d'un groupement présente un aspect en mailles de filet avec des points de renfor-



FIG. 5.

cement bien nets (fig. 5), qui correspondent aux centres des amas initiaux.

C'est cette disposition en mailles de filet qui donne naissance au voile que l'on observe au stade de prolifération maximum de la culture.

Il va de soi que les préparations qui présentent cette structure ne peuvent être obtenues qu'en usant de précautions extrêmes. l'examen portant sur un morceau de voile prélevé en évitant toute agitation. Faute de quoi on n'observerait que des fragments de torsades et d'écheveaux qui ne donneraient qu'une idée erronée de la disposition des bacilles ; la structure en mailles de filet ne serait plus visible. Non seulement la disposition topographique ne serait pas respectée, mais l'emplacement des bacilles plus ou

moins intensément teints ne correspondrait que très imparfaitement à la réalité (fig. 6).

Les caractères morphologiques généraux à ce stade d'évolution sont :

1° La très faible affinité générale des bacilles pour les colorants. Une partie est presque non acido-résistante et ne s'individualise que par de petits éléments roses en grains de poussière. Très souvent la substance cyanophile remplit les espaces entre ces très petits éléments très faiblement acido-résistants. Elle



FIG. 6.

donne l'impression d'apporter à ces petits éléments le complément nécessaire pour en faire des bâtonnets.

2° La petite taille et l'aspect frêle des microbes. Certains sont si petits que leur forme est difficilement appréciable à l'œil.

A ce moment, trois à quatre jours après l'ensemencement, toute la culture contient déjà un nombre assez important de microbes qui constituent une fine pellicule visible au fond du tube.

Arrivée à ce stade, la culture a atteint son maximum de développement par division active (voir à ce sujet la deuxième partie de ce travail). Le processus d'allongement des chaînes va dorénavant se faire par un nouveau processus, consistant dans la croissance et le développement individuels des éléments dont la multiplication a formé les chaînes microbiennes. On peut désigner ce stade par le terme de maturation de la culture.



OBSERVATION VI (de la quatre-vingt-seizième à la cent quatre-vingt-seizième heure après l'ensemencement). — A partir de ce moment, les éléments cellulaires inclus dans les torsades continuent à évoluer. Ils augmentent de taille et leur acido-résistance va en augmentant jusqu'à atteindre celle des bacilles en état de maturation complète.

Les corpuscules roses, en grains de poussière, ont pris l'aspect de petits bâtonnets qui sont encore peu acido-résistants, étant souvent encore inclus dans la substance cyanophile de complément (voir observ. V).

Les bâtonnets les plus âgés, mais qui sont peu nombreux, ont acquis presque la taille et l'acido-résistance des bacilles normaux car ils se colorent uniformément en rouge foncé (fig. 9).

On trouve à ce moment tous les états intermédiaires, tant au point de vue de la taille que de l'acido-résistance, entre les deux extrêmes.

Pendant que la maturation des bacilles se poursuit, les bâtonnets, qui ont atteint presque la taille des bacilles adultes, se séparent facilement par fragmentation des longues torsades ou des échevèaux, à condition que la culture soit un tant soit peu agitée (fig. 6, 7, 8, 9).

Au début de ce stade de maturation les amas détachés des torsades ont habituellement la longueur de plusieurs bacilles (fig. 6). Puis, au fur et à mesure que le processus se poursuit, la fragmentation des torsades donne naissance à des amas plus réduits (fig. 8 et 9). Cette fragmentation se fait dans le sens transversal mais non longitudinal de sorte qu'on arrive finalement à la formation de petits amas assez réguliers puisqu'ils sont habituellement constitués par un ensemble de 4 à 5 bacilles.

Comme ces amas naissent par fragmentation transversale de filaments, leur composition n'est pas nécessairement homogène puisque des fragments peuvent s'être accolés sans que des éléments de même âge soient côte à côte. On observe donc :

I. — Des amas formés de bâtonnets provenant du même groupe-mère. Ils sont :

- Soit au même stade d'évolution ;
- Soit à des stades successifs d'évolution.

II. — Des amas consistant en microbes provenant de différents groupes-mères qui sont eux-mêmes, au hasard des accolements :

- Soit au même stade d'évolution ;
- Soit à des stades d'évolution très différents, certains de leurs éléments étant encore en multiplication active, alors que d'autres sont déjà à l'état adulte.

A ce moment la croissance, telle qu'on peut l'apprécier macroscopiquement, cesse pendant quelques jours (deux à quatre). Cet arrêt macroscopique de croissance décrit tout d'abord par Dubos,

et confirmé par plusieurs auteurs, est suivi par une nouvelle phase de croissance. A partir des bords de la pellicule on voit se développer de fines membranes qui grimpent le long de la paroi du verre.

Une légère agitation ne brise pas la pellicule, mais ses bords se roulent légèrement vers le centre. En agitant plus fortement,



FIG. 7.



FIG. 8.



FIG. 9.

la pellicule se brise et donne à l'œil nu l'impression d'une suspension homogène.

Pendant l'arrêt de développement, la population microbienne subit de grandes modifications qui consistent surtout en deux processus (fig. 10 et 11) :

- a) Désintégration ;
- b) Développement du second cycle de croissance.

a) Le processus de désintégration se produit dans les cellules qui paraissent être les plus âgées. Elles présentent :

- 1° Soit une transformation en corps amorphes ;
- 2° Soit une lyse directe.



1° CORPS AMORPHES. — Dans ce cas, les parois cellulaires disparaissent et les cellules transformées en corps amorphes se colorent en rouge intense à bords noirâtres dont les tailles sont extrêmement variables, allant de la taille de petits cocci jusqu'à celle de gros cristaux (fig. 10).

Par la suite, les corps amorphes deviennent verdâtres et à la fin on ne voit plus que leur bordure noire.

2° LYE DIRECTE. — Dans le cas de lyse (fig. 10), telle qu'on la voit dans la même préparation, les cellules fusionnent



FIG. 10.

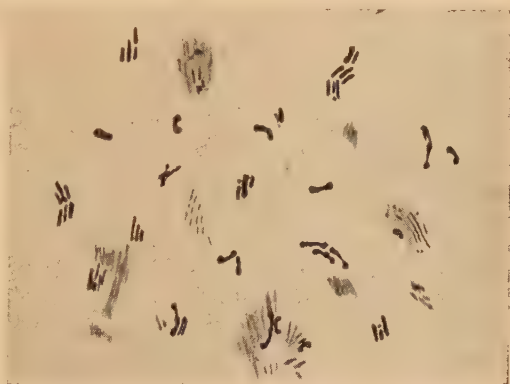


FIG. 11.

ensemble, perdent leurs contours en formant des taches roses qui deviennent plus tard cyanophiles.

Nous ne pouvons pas dire, d'une façon sûre, si ces deux formes de désintégration sont des stades successifs du même processus ou s'ils doivent être interprétés comme des phénomènes différents. Nos observations ne nous permettent de formuler aucune conclusion définitive sur ce point, mais nous pensons que l'origine des bacilles, éléments très âgés, ou au contraire provenant d'une division plus récente, qui forment les amas, peut avoir une assez grande importance et déterminer soit l'un, soit l'autre mode de désintégration. De plus, dans les amas contenant encore des bacilles en multiplication active, nous n'avons jamais pu observer la transformation des bacilles les plus âgés en corps amorphes, mais ils paraissent bien pouvoir subir la lyse directe.

Il semble que le processus de désintégration permette le développement d'un nouveau cycle de division, sans doute par la libération de certains bacilles jeunes qui étaient jusque-là accolés aux bacilles sénescents.

b) DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU CYCLE. — Les bâtonnets acido-résistants semblables à ceux observés dans l'observation I commencent à repasser par les mêmes stades de développement que nous avons déjà décrits. On ne peut plus distinguer aussi nettement la succession des différents stades. Ils sont masqués par l'existence des formes de désintégration et par la présence d'éléments cyanophiles. Les éléments acido-résistants sont mêlés à un grand nombre de bacilles cyanophiles de taille normale ou de petites formes filamenteuses soit avec des granules, soit colorées de façon homogène. Les rapports quantitatifs entre les éléments acido-résistants et cyanophiles varient au cours de la phase stationnaire de la culture.

IMPORTANCE DE LA QUANTITÉ DE CULTURE ENSEMENCÉE. — Les cultures qui ont été faites avec des ensemencements plus ou moins importants présentent des modifications par rapport aux observations précédentes. Par exemple, les cultures faites avec une petite quantité de semence s'en distinguent par les points suivants :

1° Pendant la période d'accroissement actif, les groupes cellulaires formés sont plus grands et les filaments poussant à partir d'un bacille donné sont plus longs. Les plus longs filaments que nous ayons vus étaient formés de 16 bâtonnets et éléments plus petits.

2° Les premières formes bacillaires adultes et sénescents apparaissent plus tôt, habituellement dès la phase de formation des écheveaux.

3° On peut voir apparaître plus tôt les premiers corps amorphes.

En conclusion, nos observations nous permettent de décrire des phases plus ou moins bien définies dans la multiplication du bacille aviaire.

1° On observe tout d'abord une phase de multiplication par division rapide ;

2° Elle est suivie par une phase de maturation où l'on voit les éléments qui se sont rapidement divisés au stade précédent acquérir chacun leur développement normal.

3° Puis apparaissent des phénomènes de désintégration qui aboutissent à la lyse microbienne et à la formation de corps amorphes.

4° A partir de ce moment, la culture peut présenter une nouvelle phase de développement qui évolue sensiblement de la même façon que la précédente.

# ÉTUDE SUR QUELQUES INHIBITIONS DE L'ACTION DE LA STREPTOMYCINE

par B. RYBAK, M<sup>me</sup> F. GRUMBACH et F. GROS (\*).

(Institut Pasteur.)

Dans un mémoire précédent [1], nous avons particulièrement étudié et discuté certaines *inactivations* partielles ou totales de la streptomycine en fonction du mode d'action de cet antibiotique.

Dans le présent travail, nous examinons l'action de certaines substances du point de vue de leur pouvoir *inhibiteur* sur l'activité de la streptomycine. Ces substances seront de deux types :

a) Celles qui se combinent avec la streptomycine pour donner des composés insolubles [2, 3, 4, 5, 6] ;

b) Celles qui dissolvent les composés insolubles entre la streptomycine et les substances sensibles bactériennes ou inhibent leur formation : les sels.

Nous voudrions ainsi attirer l'attention sur le cas de la streptomycinase entérococcique de Sureau et coll. [7], substance qui, d'après ces auteurs, serait un *enzyme* détruisant la streptomycine, analogue à la pénicillinase qui détruit la pénicilline ; il s'agirait alors d'un inactivateur. Nous allons démontrer que l'action de cette substance relève en réalité d'une inhibition et indiquer la nature chimique de la « streptomycinase ».

## CAS DE LA STREPTOMYCINASE ENTÉROCOCCIQUE (1).

L'un de nous ayant eu à pratiquer un dosage différentiel de pénicilline et de streptomycine chez un malade recevant un traitement pénicillino-streptomyciné se réfère au travail de Sureau et coll. ; ce dosage a pu être réalisé dans le sang (par la technique des dilutions) ; quant au dosage différentiel dans l'urine, il a été impossible de l'effectuer. En effet, ce dosage pratiqué

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 avril 1949.

(1) La préparation de la streptomycinase a été effectuée d'après les données de Sureau et coll. avec la souche d'entérocoque utilisée par ces auteurs.



par la technique de Heatley en plaques de gélose révélait toujours, malgré l'utilisation de fortes doses de streptomycine et après destruction de la pénicilline par la pénicillinase, la présence de streptomycine en grande quantité. Par conséquent, la streptomycine n'était pas détruite par la « streptomycine » comme l'était la pénicilline par la pénicillinase.

Nous avons alors voulu vérifier s'il y avait ou non destruction de la streptomycine par la streptomycinase dans les tubes de milieu de culture où la streptomycine n'agissait plus comme antibiotique et permettait au germe ensemencé de se développer. Comparativement, nous avons étudié de la même façon la destruction de la pénicilline par la pénicillinase.

Dans des tubes de milieu de culture (2) [5 ml.] nous avons mis en présence des doses croissantes de streptomycine (de 10 à 400 U.) avec une dose fixe de filtrat entéroccocque (0,5 ml.), ensemencement pratiqué avec *Staphylococcus aureus* L. (dilution finale  $10^{-4}$ ). Des témoins étaient établis dans les mêmes conditions, mais sans filtrat entéroccocque. Avec la pénicillinase, les doses de pénicilline employées étaient de 1.000 à 15.000 U. O. et la dose de pénicillinase 0,05 ml. dans 5 ml. de milieu de culture.

Après quarante-huit heures d'étuve à 37° C, on constate effectivement un léger empêchement de l'action de la streptomycine par le filtrat entéroccocque comparativement au témoin. Nous avons alors dosé la streptomycine (par la technique Heatley en plaque de gélose) dans tous les tubes (que le staphylocoque ait pu ou non se développer) et nous avons constaté que, partout, on retrouvait intégralement la dose initiale de streptomycine, tandis que, par le même procédé de titrage de la pénicilline, on ne retrouvait pas de pénicilline là où le staphylocoque avait pu se développer (tableau). La streptomycine n'avait donc pas été détruite comme la pénicilline l'est par la pénicillinase. Il y a eu simplement inhibition de l'action de la streptomycine, ce qui a permis au staphylocoque de se développer.

Dans une note précédente [8], nous avons exposé ce qui nous a amenés à mettre en évidence la véritable nature de l'action de la soi-disant « streptomycinase ». Rappelons les faits :

D'une part la streptomycine forme des composés insolubles particulièrement avec les acides nucléiques ou les nucléoprotéines [1, 2, 3, 4, 5] et d'autre part, l'autolyse bactérienne est une des techniques d'obtention des nucléoprotéines [9]. Or, la streptomycinase existe, d'après Sureau et ses collaborateurs, dans des cultures d'entérocoques âgées de douze jours ou plus. Dans ces conditions, le nombre de germes morts (autolysés ou en voie d'autolyse) est considérable. Ceci nous a amenés à rechercher des

(2) Cf. Composition de notre milieu dans la discussion.

TABLEAU.

UNITÉS PÉNICILLINE	CULTURE		UNITÉS PÉNICILLINE Dosage Heatley ( <i>staphylococcus aureus</i> L.)
	16 heures	48 heures	
Pénicillinase, 0,05 ml. dans 5 ml. de peptone glucosée :			
15.000 . . . . .	—	—	6.000 u.
10.000 . . . . .	—	—	Dil. 1/100 = 0
8.000 . . . . .	—	—	Dil. 1/100 = 0
6.000 . . . . .	—	+	0
4.000 . . . . .	—	+++	0
2.000 . . . . .	—	+++	0
1.000 . . . . .	+++	+++	0
Témoin pénicilline :			
0,50 . . . . .	—	—	
0,40 . . . . .	—	—	
0,30 . . . . .	—	—	
0,20 . . . . .	—	±	
0,15 . . . . .	±	++	
0,10 . . . . .	++	++	
Ensemencement <i>Staphylococcus aureus</i> L. Dilution finale 10 <sup>-4</sup> d'une culture de 24 heures.			
UNITÉS STREPTOMYCINE	CULTURE		UNITÉS STREPTOMYCINE Dosage Heatley (spores <i>B. subtilis</i> W.)
	16 heures	48 heures	
Streptomycinase, 0,5 ml. dans 5 ml. de peptone glucosée :			
400. . . . .	—	—	400
300. . . . .	—	—	300
250. . . . .	—	—	
200. . . . .	—	+++	200
150. . . . .	—	+++	
100. . . . .	—	+++	100
50. . . . .	—	+++	50
10. . . . .	+++	+++	Pas décelable.
Témoin streptomycine :			
300. . . . .	—	—	300
200. . . . .	—	—	200
150. . . . .	—	—	
100. . . . .	—	+++	100
50. . . . .	—	+++	50
20. . . . .	±	+++	
10. . . . .	+++	+++	Pas décelable.
Ensemencement <i>Staphylococcus aureus</i> L. Dilution finale 10 <sup>-4</sup> .			
N. B. : —, absence de culture; +++, culture abondante.			

nucléoprotéines dans le filtrat d'entérocoque d'une culture de douze jours en bouillon à 37°, et nous avons obtenu par précipitation à l'acide acétique à pH 3,5 une nucléoprotéine dont nous n'avons pas effectué la purification [N total, 14,83 p. 100 ; P total, 1 p. 100 ; ribose, 2,6 p. 100] (3). Remise en solution à pH 7 dans l'eau bidistillée, cette nucléoprotéine a formé un complexe insoluble avec la streptomycine. De plus, lorsqu'on redissout cette nucléoprotéine dans le volume initial de bouillon, on retrouve la même inhibition de l'action de la streptomycine que dans le cas du filtrat originel. Comparativement, nous avons contrôlé l'action d'une solution d'acide ribonucléique de levure (Byla) à pH 7 aux concentrations de 1 à 10  $\gamma$  par millilitre. On obtient une inhibition de l'action de la streptomycine tout à fait semblable à celle obtenue avec la nucléoprotéine de l'entérocoque.

#### INHIBITION PAR L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE.

Ceci nous a amenés à étudier *in vitro* (avec comme germe sensible *Staphylococcus aureus* L ; dilution finale :  $10^{-4}$  d'une culture de vingt-quatre heures), l'action de l'acide ribonucléique à différentes concentrations sur la streptomycine.

La technique employée a été la suivante : dans un volume fixe (5 ml. de milieu de culture, peptone glucosée), nous mettons en présence des doses variables de streptomycine avec un volume fixe (0,5 ml.) de solutions à différentes concentrations d'acide ribonucléique de levure (de 0,01 à 10 mg. par millilitre). On constate que pour de faibles doses d'acide ribonucléique (0,5 ml. d'une solution à 0,1 ou 0,01 mg. par millilitre dans 5 ml., soit une concentration finale de 0,01 ou 0,001 mg. par millilitre) il y a une nette inhibition de l'action de la streptomycine ; il se produit une neutralisation de la streptomycine par l'acide ribonucléique, comme l'étude chimique l'a montré [5]. Cette inhibition se manifeste même pour de très faibles concentrations (0,0001 et 0,00001 mg. par millilitre). Par contre, pour les plus fortes concentrations (2,5 et 10 mg. par millilitre, soit une concentration finale de 0,25 et 1 mg. par millilitre), on observe une augmentation de l'action de la streptomycine ; or, nous avons pu constater par ailleurs qu'un excès d'acide ribonucléique redissout le complexe formé entre la streptomycine et l'acide ribonucléique, c'est ce qui permet à la streptomycine d'agir dans notre expérience. C'est pourquoi aussi Linz [10] n'a pu constater d'inhibition de la streptomycine par l'acide ribonucléique, ayant travaillé avec la solution à 1/2 saturation de cet acide.

(3) On voit que la nucléoprotéine est souillée, sans doute par une protéine entraînée au cours de la précipitation acétique.



## ACTION DES SELS.

Poursuivant l'étude de cette « streptomycine » entérococcique, nous avons constaté que le filtrat, débarrassé de la nucléoprotéine par précipitation acétique à pH 3,5 et ramené à pH 7 par la soude était aussi actif, voire même plus actif que le filtrat non traité. Or ce filtrat, acidifié et reneutralisé pour pouvoir effectuer les essais biologiques, contient, de ce fait, une forte concentration d'acétate de sodium. D'après les travaux de deux d'entre nous [5], les sels neutres dissolvent le complexe streptomycine-acide nucléique, l'acétate de sodium étant un des meilleurs solvants. On conçoit de ce fait l'inhibition de la streptomycine par ce filtrat débarrassé de la nucléoprotéine. Des solutions d'acétate de sodium à différentes concentrations ont été essayées en présence de streptomycine [germe sensible : *Staphylococcus aureus* L. (4)]. Il ressort de notre étude que pour des solutions N, N/2 et N/5 (concentrations finales N/10, N/20 et N/50) on constate une inhibition de la streptomycine ; pour N/10 (concentration finale N/100) il n'y a plus d'inhibition.

D'autres sels ont été essayés. Nous avons déjà examiné le rôle du chlorure de calcium [4]. Avec le citrate de Na, le chlorure de Na, on trouve des actions analogues à celle de l'acétate, l'action du citrate étant particulièrement forte. Le borate de Na a également été essayé et s'est révélé être un inhibiteur de la streptomycine à la concentration finale N/1.000 et N/10.000. A plus fortes concentrations (N/10) le borate seul est antibactérien, mais ne l'est plus aux concentrations N/20, N/50 où il favorise légèrement l'action de la streptomycine. Ces faits cadrent parfaitement bien avec l'étude chimique [5].

## DISCUSSION.

La question de la « streptomycine » entérococcique a donc amené une réponse qui pourrait rejoindre les conclusions de certaines expériences de Linz [41], où des bactéries chauffées inhibent l'action de la streptomycine. Du point de vue pratique, un dosage différentiel de la streptomycine est possible dans le sang, mais on peut aussi bien utiliser pour cela une solution de citrate ou d'acétate de sodium, technique par laquelle on obtient le même effet d'inhibition. En fait de streptomycine, on ne connaît que la mannosidostreptomycine [42] des cultures d'*Actinomyces griseus*.

(4) Ensemencement à  $10^{-4}$ , dilution finale d'une culture de vingt-quatre heures. On place 0,5 ml. de la solution saline étudiée dans 5 ml. de peptone glucosée.

La règle générale sur laquelle nous voudrions insister peut s'énoncer ainsi : *la streptomycine, en tant que substance basique, possède des propriétés telles que les substances d'un poids moléculaire relativement élevé et à point isoélectrique acide l'inactivent par affinité acide-base.* C'est le cas des acides nucléiques, déjà signalé par von Euler et Heller [13] ; ce devrait être le cas de l'héparine par exemple (5). On ne saurait donc appliquer le principe d'isostérie au cas de la streptomycine. Nous devons signaler à ce sujet que la peptone inhibe également l'action de la streptomycine [14], or, nous avons pu constater que la peptone Chapoteaut forme un composé insoluble avec la streptomycine ; on peut donc considérer que cette inhibition par la peptone entre dans le cas général des inhibitions acide-base. De même, nous pensons que l'inhibition par un extrait de cœur-cerveau (Difco) [15] est due aux céphalines ; il est possible, particulièrement, que le cardiolipide intervienne. L'inhibition par les sels nous paraît être due à leur pouvoir de dissolution ou d'inhibition de formation des complexes streptomycine-substances sensibles acides bactériennes ; cette action inhibitrice avait déjà été signalée sans être explicitée par May, Voureka et Fleming [16] et par Linz [10] dans le cas unique du chlorure de sodium ; S. Cohen [2] a été le premier à montrer le pouvoir solvant de ClNa sur le complexe streptomycine-acide désoxyribonucléique. Des études ont été également effectuées par Loo et ses collaborateurs [17], par Berkman et ses collaborateurs [18] et par Quan [19] avec du phosphate, du chlorure, de l'acétate, du bicarbonate, du sulfate de sodium, de potassium ou d'ammonium ; les résultats obtenus par la technique en plaque de gélose sont divergents ; ils conduisent à penser qu'il convient de distinguer entre l'effet des sels lorsque ceux-ci sont inclus dans la gélose et lorsqu'ils sont placés dans la solution de streptomycine, les phénomènes de diffusibilité et d'adsorption sont alors très différents. Donovick et ses collaborateurs [20], reprenant l'étude de S. Cohen [2] sur les complexes streptomycine-acide désoxyribonucléique (S-AD), ont obtenu des résultats en contradiction avec ceux de cet auteur. Ainsi, l'acétate de sodium et le pyruvate de sodium, qui sont des solvants de S-AD, n'inhiberaient pas l'action antibiotique de la streptomycine. Ce résultat est en contradiction avec certains résultats de Green [21] et avec certains de ceux que nous rapportons dans le présent travail. Il est possible que les germes différents utilisés (*K. pneumoniae*, Gram -, par Donovick et ses collaborateurs ; *S. aureus*, Gram +, dans nos expériences) puissent se comporter différemment.

(5) Nous avons constaté que l'héparine formait des complexes insolubles avec la streptomycine, ces complexes se solubilisent dans un excès d'héparine.

Cependant, nous avons effectué quelques vérifications sur *K. pneumoniae* en milieu peptone glucosée, et le citrate, l'acétate de sodium ont fourni des résultats comparables à ceux obtenus avec *S. aureus* ; le type de germe ne paraît donc pas en cause. Il est à remarquer que Donovanick et ses collaborateurs ont travaillé en milieu synthétique, donc déjà riche en sels, et il est possible que la sensibilité des germes au pouvoir antistreptomycine de sels donnés soit dans ces conditions amenée à des niveaux tels que le pouvoir inhibiteur est imperceptible. De plus, leur technique d'étude des sels inhibiteurs consiste à *substituer* à un constituant essentiel du milieu synthétique de base (le lactate de sodium) un des sels étudiés ; nous avons opéré en *ajoutant* séparément les sels considérés à notre milieu de base constitué de la sorte : ClNa 5 g. par litre ; glucose, 2 g. par litre ; peptone Uclaf, 20 g. par litre ; eau de source. On conçoit mal la nécessité de la substitution, d'autant plus que le milieu de Donovanick renferme une quantité non négligeable de phosphates, eux-mêmes doués d'une activité antistreptomycine, d'après Donovanick et ses collaborateurs précisément ; ces phosphates peuvent masquer l'action d'autres sels comme l'acétate ou le pyruvate ; soulignons que les milieux ainsi substitués ne sont nullement comparables au milieu témoin. Remarquons encore que Donovanick et ses collaborateurs ont étudié le cas du complexe S-AD ; or, l'acide désoxyribonucléique a une situation bactérienne telle qu'il ne peut intervenir dans la fixation primaire de la streptomycine, tandis que nous avons travaillé avec le complexe S-acide ribonucléique ou encore S-céphaline. Enfin, les résultats de Donovanick et de ses collaborateurs sont surprenants par un autre côté. Ils n'ont pu constater que l'acide désoxyribonucléique est résistant à la dépolymérisation par la désoxyribonucléase. Or, dans le cas de l'acide ribonucléique-streptomycine [5], nous avons pu montrer que la ribonucléase ne pouvait détruire l'acide ribonucléique ainsi complexé. D'une part, la technique utilisée par les auteurs américains est assez qualitative et, d'autre part, leur résultat pourrait se comprendre en considérant que la quantité de streptomycine utilisée (0,125 ml. à 0,5 p. 100) serait beaucoup trop faible par rapport à celle de l'acide désoxyribonucléique mise en jeu (0,25 ml. à 0,025 p. 100) pour que la streptomycine puisse se combiner avec tout l'acide nucléique et inhiber ainsi sa dépolymérisation enzymatique. Mais nous pensons surtout que pour activer la désoxyribonucléase, Donovanick et ses collaborateurs ont utilisé du chlorure de magnésium qui est un solvant du complexe alors que nous avons travaillé en eau distillée ou en présence de borate à une concentration telle que le complexe streptomycine-acide ribonucléique est *insoluble* [5]. Soulignons que, dans ces expériences avec l'acide ribonucléique et la streptomycine, pour 2 mg. d'acide



ribonucléique, moins polymérisé que l'acide désoxyribonucléique, l'inhibition de la dépolymérisation nucléasique de l'acide ribonucléique engagé dans le complexe insoluble n'était totale que pour 20.000 unités de streptomycine à pH 7,0 ; or, insistons sur ce point : les auteurs américains n'indiquent pas le pH auquel ils ont travaillé et nous avons pu montrer que le pH avait une action certaine sur le phénomène de dépolymérisation enzymatique de l'acide ribonucléique complexé à la streptomycine [5]. On peut donc considérer que si les conditions de pH sont favorables et étant donné de plus la présence de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , il est possible d'obtenir une dépolymérisation enzymatique par déplacement d'équilibre : on peut concevoir, en effet, que dans les conditions des expériences de Donovick et collaborateurs, les fractions libres (par dissociation et par non-combinaison) d'acide désoxyribonucléique étaient dépolymérisées par la nucléase spécifique, de nouvelles fractions d'acide désoxyribonucléique sont libérées du complexe S-AD ; ce complexe disparaîtrait ainsi.

Aussi, l'inhibition par les sels organiques décelée par Green [21] nous paraît relever principalement du mécanisme de solubilisation des composés streptomycine-substances bactériennes à point iso-électrique acide et non pas tant d'une détoxication par une substance qui constitue le point d'attaque de l'antibiotique.

En définitive, le mode d'action de la streptomycine s'apparente à celui des colorants basiques (« vitaux » et anti-microbiens) ; nous nous demandons dans quelle mesure l'action inhibitrice du pH d'une part et du glucose dans des conditions données d'autre part, sur l'action de la streptomycine et des colorants basiques, ne donne pas des raisons de plus d'effectuer la relation. Peacocke et Hinshelwood [22] ont montré en effet qu'à  $\text{pH} < 6$ , l'absorption totale du cation proflavine diminue (voir discussion en [1]) et que la présence de glucose diminue l'absorption de la proflavine (6). Toutefois, la constitution spéciale de chaque molécule basique correspond à des propriétés spécifiques des molécules considérées (poids moléculaire, présence de certaines fonctions induisant des propriétés chimiques et physico-chimiques données) ; en ce sens il y a donc une certaine spécificité, mais celle-ci ne nous paraît représenter qu'une propriété annexe. Remarquons que, dans le cas précis de la streptomycine, on pourrait considérer le mode d'action d'une autre façon : Peek et ses collaborateurs [23] ont montré que la streptidine seule était inactive, la streptobiosamine l'est également ; on peut alors se demander si cette inactivité de la fraction hautement basique

(6) On peut se demander si la streptobiosamine ou ses constituants inhibent l'action de la streptomycine.

streptidique est liée à son faible poids moléculaire ou si la streptomycine ne serait pas active également par sa fraction streptobiosaminique, celle-ci étant acceptée dans le métabolisme bactérien jusqu'au moment où la fraction streptidine l'enrayerait ; il y aurait là un mécanisme par « piège » ; nous n'avons pas vérifié cette hypothèse et nous ne la présentons que pour susciter la discussion.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] RYBAK (B.), GROS (F.) et GRUMBACH (M<sup>me</sup> F.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 148.
- [2] COHEN (S. S.). *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 511.
- [3] MASSART (L.) et Coll. *Experientia*, 1947, **3**, 288.
- [4] BERKMANN (S.) et Coll. *J. Bact.*, 1947, **54**, 6.
- [5] GROS (F.) et RYBAK (B.). *Helv. Chim. Acta*, 1948, **31**, 1855.
- [6] RYBAK (B.) et GROS (F.). *Experientia*, 1948, **4**, 396.
- [7] SUREAU (B.) et Coll. *Ces Annales*, 1948, **75**, 169.
- [8] GRUMBACH (M<sup>me</sup> F.), RYBAK (B.) et GROS (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **22**, 872.
- [9] VENDRELY (R.). *Experientia*, 1947, **3**, 196.
- [10] LINZ (R.). *Rev. Belge Path. Med. Exp. Suppl. III*, 1948, **19**, 78 p
- [11] LINZ (R.) et LECOCQ, (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1064.
- [12] PERLMANN (D.) et LANGLYKKE (A. F.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 3968.
- [13] VON EULER (H.) et HELLER (L.). *Ark. Kemi*, 1948, **26 A**, n° 14. 224.
- [14] DONOVICK (R.) et RAKE (G.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a Med.*, 1946, **61**, 224.
- [15] RHYMER (I.) et WALLACE (G. I.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 521.
- [16] MAY (J. R.), VOUREKA (A. E.) et FLEMING (A.). *Brit. med. J.*, 10 mai 1947, 627.
- [17] LOO (Y. H.) et Coll. *J. Bact.*, 1945, **50**, 701.
- [18] BERKMAN (S.), HENRY (R. J.) et HOUSEWRIGHT (R. D.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 567.
- [19] QUAN (S. F.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 25.
- [20] DONOVICK (R.) et Coll. *J. Bact.*, 1948, **56**, 125.
- [21] GREEN (S. R.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 7.
- [22] PEACOCKE (A. R.) et HINSHELWOOD (C.). *J. Chem. Soc.*, 1948, 2290.
- [23] PECK (R. L.) et Coll. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 29.

## **ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR LES BACTÉRIES NON PROLIFÉRANTES**

### **I. — AGGLUTINATION DES BACTÉRIES PAR LA STREPTOMYCINE**

par FRANÇOIS GROS, MICHEL MACHEBOEUF, BORIS RYBAK, PAULETTE LACAILLE.

(*Institut Pasteur.*)

Quelques travaux ont déjà été consacrés à l'étude des modifications du métabolisme microbien par la streptomycine (Gros et Machebœuf [1, 2, 3], puis Henry et al. [4]). Cet antibiotique n'influe pas sur le catabolisme glucidique ni sur le catabolisme protéique des bactéries non proliférantes, mais il inhibe le catabolisme des acides nucléiques en agissant à deux étapes de ce catabolisme : 1° il freine la dépolymérisation de l'acide ribonucléique sous l'influence de la ribonucléodépolymérase, 2° il inhibe profondément la lyse des mononucléotides. D'autre part, des recherches ont porté sur les modifications morphologiques de la cellule bactérienne sous l'influence de l'antibiotique : Levaditi et Henry [5, 6], Price [7], puis Strauss [8], Tulasne [9] et, enfin, Kellenberger [10]. Les cellules bactériennes en présence de concentrations subléthales de streptomycine évoluent vers des formes allongées, gonflées et anargyrophiles. Citons tout particulièrement le travail très récent de Kellenberger effectué avec l'aide du microscope électronique. Rappelons enfin le travail de Linz [11] qui prouve que, contrairement à l'opinion de Waksman et Schatz [12], la streptomycine est absorbée par les bactéries placées dans un bouillon en présence de l'antibiotique. Néanmoins, la quantité fixée est remarquablement faible. La quantité fixée croît au début et atteint une limite en quatre heures. La cystéine et le chlorure de sodium gênent la fixation de la streptomycine sur la bactérie et la streptomycine peut être éluée par les solutions de ClNa.

La plupart des expériences que nous venons de citer ont été accomplies sur des bactéries placées dans un milieu nutritif et souvent même sur des bactéries proliférantes (cas des doses infra-léthales d'antibiotiques). C'est seulement pour savoir si la streptomycine était antiseptique et capable de tuer les bactéries non proliférantes que quelques essais ont porté sur des suspensions de bactéries dans l'eau physiologique en l'absence d'aliments



(Hamre et al. [13], Klein et Klimmelmann [14], Smith et Waksman [15], Middlebrook et Yegian [16]. La streptomycine s'est alors révélée bactéricide seulement lorsque sa concentration et la durée du contact sont suffisantes, mais elle est bactériostatique à des doses très inférieures. Cependant, Middlebrook et Yegian signalent que la streptomycine n'est pas bactéricide pour *Mycobacterium tuberculosis* non proliférant, bien qu'elle le soit fortement pour cette bactérie lorsqu'elle est en voie de développement. Gros et Machebœuf [17], opérant sur des suspensions de bactéries non proliférantes, ont noté que la streptomycine ralentit l'autolyse du *Clostridium sporogenes* et Linz [11] retrouva ce fait pour un staphylocoque en anaérobiose.

Nous poursuivons une série de recherches biochimiques sur le mode d'action de la streptomycine sur des bactéries non proliférantes. Nous réservons pour un mémoire ultérieur nos observations au sujet de l'autolyse en présence de l'antibiotique et nous rapportons seulement aujourd'hui le résultat de recherches effectuées sur l'agglutination par la streptomycine de certaines bactéries mises en émulsion dans de l'eau distillée. Ce phénomène d'agglutination, découvert récemment par nous [18], a permis diverses expériences, dont les résultats éclairent certains aspects du problème biochimique de la streptomycine.

#### POUVOIR AGGLUTINANT DE LA STREPTOMYCINE.

L'action agglutinante de la streptomycine vis-à-vis de certaines bactéries était passée inaperçue du fait que, contrairement à la plupart des autres agents agglutinants connus (agglutinines, colorants basiques, etc.), la streptomycine ne manifeste cette action qu'en l'absence d'électrolytes.

En effet, les sels inhibent l'agglutination par la streptomycine dès qu'ils atteignent une concentration relativement faible. Par contre, si l'on réalise les suspensions bactériennes dans l'eau distillée, le phénomène revêt une grande netteté.

MODE OPÉRATOIRE DANS NOS ESSAIS. — Les bactéries provenant de cultures jeunes (dix-huit heures en général) sont séparées du milieu de culture, puis mises en suspension dans de l'eau distillée, en opérant de façon à avoir finalement 1 à 3 mg. de corps bactériens (poids sec) par millilitre de suspension. On mélange 1 ml. de cette émulsion concentrée avec 1 ml. d'une solution de streptomycine cristallisée à 5 mg. par millilitre ; puis on complète le volume à 5 ml. par de l'eau distillée. On réalise chaque fois un témoin ne comportant que les bactéries en émulsion dans de l'eau distillée sans streptomycine. Ces témoins nous ont permis d'écarter de notre étude les quelques espèces microbiennes qui ne donnent pas d'émulsions stables. Etant donné que l'on

opère dans de l'eau distillée, l'émulsion est stable pour la plupart des souches microbiennes, même pour certaines qui seraient spontanément agglutinées dans l'eau physiologique.

Toutes les émulsions, dès leur préparation, sont homogénéisées par agitation, puis placées dans un thermostat à 37° C. On observe fréquemment leur aspect. L'agglutination est parfois instantanée (*Bac. mesentericus* et *Vibrio metschnikowii*, par exemple), mais, le plus souvent, elle s'observe après vingt à trente minutes, suivant les espèces. Pour certaines souches, enfin, l'agglutination ne se produit jamais (même après une attente de vingt-quatre heures).

On pouvait se demander si l'agglutination par la streptomycine était un caractère spécifique. Mais lorsqu'on étudie des espèces appartenant au groupe des Salmonelles, on peut voir, pour une même espèce, une souche agglutinée et une autre non agglutinée. Nous avons pu finalement observer que ce sont pour les Salmonelles les variantes *Smooth* qui résistent à l'agglutination, tandis que les *Rough* sont toutes agglutinées parfaitement.

Il y a un certain parallélisme entre l'agglutinabilité et la sensibilité des espèces à l'action antibiotique et il n'y a pas de parallélisme rigoureux entre l'agglutinabilité et le caractère Gram-positif des bactéries, comme on peut le voir d'après le tableau. Il existe cependant une certaine relation d'ordre physico-chimique entre le caractère Gram + et l'agglutinabilité (p. 258). D'ailleurs toutes les bactéries à Gram + que nous avons étudiées sont agglutinées.

Le tableau ci-contre résume nos observations sur une série d'espèces microbiennes. Lorsque aucune indication R ou S ou O ou Vi ne figure à côté du nom d'espèce, il s'agit d'une simple souche de collection. La lettre S ou la lettre R indiquent que la souche est *Smooth* ou *Rough*. La lettre O indique que la présence d'un antigène O a été effectivement vérifiée dans la souche. Le symbole Vi indique que la présence d'un antigène Vi a été démontrée dans la souche étudiée. Nous indiquons par le signe + une agglutination très nette et assez rapide (moins d'une heure) et par le signe  $\pm$  une agglutination tardive ou bien une agglutination tardive et partielle.

Les résultats permettent des conclusions fort nettes (1).

1° Toutes les formes R étudiées sont agglutinées par la streptomycine dans l'eau distillée.

2° Toutes les formes S contenant un antigène O résistent à l'agglutination (antigène glucido-lipido-polypeptidique O, type Boivin-Topley-Morgan).

(1) Nous tenons à remercier vivement nos collègues MM. Dumas, Cotoni, Pochon, Bonnefoi, Le Minor et Solomides, qui nous ont remis des souches qui furent très précieuses pour ce travail.

3° Les formes S qui ne contiennent pas d'antigène complet glucido-lipido-polypeptidique type Boivin-Topley (ou tout au moins chez qui l'on n'a pas réussi à extraire de l'antigène O) sont agglutinées aussi bien que les formes R correspondantes (exemple pneumocoque). Ce n'est donc pas le fait d'être S qui suffit à empêcher l'agglutination.

ESPÈCE MICROBIENNE	CARACTÈRE GRAM	AGGLUTINATION
<i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	+	+
<i>Staphylococcus albus</i> . . . . .	+	+
<i>Staphylococcus citreus</i> . . . . .	+	±
<i>Streptococcus pyogenes</i> . . . . .	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> . . . . .	+	+
<i>Diplococcus pneumoniae</i> R . . . . .	+	+
<i>Diplococcus pneumoniae</i> S . . . . .	+	+
<i>Neisseria gonorrhoea</i> . . . . .	—	+
<i>Neisseria meningitidis</i> . . . . .	—	+
<i>Sarcina lutea</i> . . . . .	+	+
<i>Bacillus mesentericus</i> . . . . .	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> . . . . .	+	+
<i>Serratia marcescens</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SR . . . . .	—	±
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S' . . . . .	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i> . . . . .	+	+
<i>Vibrio cholerae</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Vibrio metchnikowi</i> R . . . . .	—	+
<i>Vibrio phosphorescens</i> R . . . . .	—	+
<i>Clostridium sporogenes</i> . . . . .	+	+
<i>Clostridium tetani</i> . . . . .	+	+
<i>Clostridium butyricum</i> . . . . .	+	+
<i>Ristella clostridiflora</i> . . . . .	—	+
<i>Salmonella typhi</i> (souche 0901) O et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella typhi</i> (souche Ty2) O, Vi et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella typhi</i> (souche R <sub>2</sub> ) R . . . . .	—	+
<i>Salmonella enteritidis</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella enteritidis</i> R . . . . .	—	+
<i>Salmonella paratyphenterae</i> R . . . . .	—	+
<i>Salmonella cholerae suis</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> (souche A 409) O et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> A (souche A 1015) O et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> CO et S . . . . .	—	—
<i>Salmonella paratyphi</i> CR . . . . .	—	+
<i>Salmonella abortus equi</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Shigella shigae</i> O et S . . . . .	—	—
<i>Shigella shigae</i> R . . . . .	—	+
<i>Phytomonas tumefaciens</i> O et S (souche 42/4) . . . . .	—	—
<i>Phytomonas tumefaciens</i> R (souche A <sub>6</sub> Rx) . . . . .	—	+

La seule exception apparente est *Klebsiella pneumoniae* (Friedländer), dont les souches S résistent parfaitement à l'agglutination, bien que jusqu'ici on n'en ait pas extrait d'antigène glucido-lipido-polypeptidique O. Nous n'avons pas pu étudier une



souche R pure de ce germe, mais seulement une souche très peu muqueuse, probablement un mélange de R et S : cette souche fut agglutinée tardivement et seulement partiellement. On sait que les microbiologistes ne sont pas d'accord sur cette espèce microbienne et que certains admettent l'existence d'un antigène O dans ses formes S, mais aucun auteur n'a extrait avec certitude un complexe glucido-lipido-polypeptidique antigénique. Le fait que la variante S que nous avons étudiée résiste parfaitement à l'agglutination par la streptomycine est un argument en faveur de l'existence d'un antigène O.

CONDITIONS QUI PRÉSIDENT A L'AGGLUTINATION PAR LA STREPTOMYCINE. — Dans les expériences qui viennent d'être résumées, nous avons toujours opéré avec une concentration finale en streptomycine relativement élevée : 1 mg. par millilitre ; il était intéressant de rechercher quelle était la dose minima d'antibiotique susceptible d'agglutiner un poids connu de bactéries. Nos essais dans ce but ont porté sur *Clostridium sporogenes*. Chaque tube contenait une quantité de bactéries qui correspondait à un poids sec de 8 mg. et nous avons fait varier les quantités de streptomycine mises en présence de ces bactéries. Le volume total était pour chaque tube 5 ml. Les mélanges furent placés dans un thermostat à + 37° C et l'on examina fréquemment leur aspect. Dans le tableau ci-contre, les quantités de streptomycine sont indiquées en microgrammes pour 5 ml. ; le signe — indique qu'il n'y eut pas d'agglutination macroscopique, même après cinq heures. L'agglutination est indiquée par des croix. Quatre croix signifient que le liquide surnageant est totalement limpide ; 3 croix correspondent à un liquide surnageant presque limpide ; 2 croix correspondent à un liquide surnageant qui contient encore des bactéries en suspension.

QUANTITÉ DE STREPTOMYCINE dans 5 ml. ( $\mu$ g.)	AGGLUTINATION	TEMPS ÉCOULÉ avant que l'agglutination soit observée
20.000	++++	20 minutes.
10.000	+++	20 minutes.
5.000	+++	20 minutes.
2.000	+++	40 minutes.
1.000	++	2 heures.
500	++	3 heures.
100	—	
50	—	

Dans le cas de la souche de *Clostridium sporogenes* qui a servi ici pour qu'une agglutination s'effectue, il suffit donc de

100 microgrammes de streptomycine dans 1 ml. pour 1.600 microgrammes de bactéries (poids sec) contenues dans 1 ml. d'eau (1).

**CARACTÈRES DE L'AGGLUTINATION PAR LA STREPTOMYCINE.** — Pour la plupart des souches bactériennes, l'agglutination se traduit par une agrégation en fins flocons, ou en *granules facilement dissociables par agitation*. Exceptionnellement, les agrégats formés pour certaines espèces microbiennes sont difficilement dissociables par agitation et assez gros (exemples : streptocoque, *Clostridium butyricum*).

Les bactéries agglutinées par la streptomycine conservent l'essentiel de leurs caractères morphologiques ; elles se colorent comme les témoins simplement conservés au contact d'eau distillée (le Gram n'est pas modifié) ; elles sont cependant un peu plus gonflées que les témoins (nous réservons l'étude de l'autolyse en présence de streptomycine pour un prochain mémoire).

**INFLUENCE DES SELS MINÉRAUX SUR L'AGGLUTINATION.** — La streptomycine n'agglutine les bactéries qu'en l'absence de sels minéraux ou, tout au moins, lorsque la concentration des sels est très faible.

Dans le cas du *Clostridium sporogenes*, par exemple, l'agglutination est complètement inhibée par du chlorure de sodium à concentration 0,056 M, même si la dose de streptomycine atteint 1 mg. par millilitre pour 2 mg. par millilitre de bactéries.

*De plus, si les bactéries sont déjà agglutinées, il suffit d'ajouter une dose suffisante de chlorure de sodium pour que les bactéries se dispersent (ClNa M/1 par exemple).*

**INHIBITION DE L'AGGLUTINATION PAR DES SUBSTANCES AUTRES QUE LES SELS MINÉRAUX.** — On sait que la streptomycine forme, *in vitro*, des complexes insolubles avec l'acide ribonucléique [19, 20, 21, 22]. Nous avons donc pensé que l'agglutination pouvait résulter de la combinaison de la streptomycine avec les nucléoprotéines microbiennes. Nous avons recherché si la présence d'acide ribonucléique ajouté au liquide pouvait inhiber l'aggluti-

(1) On pourrait envisager un titrage approximatif très rapide de la streptomycine basé sur cette expérience. On pourrait, par exemple, chercher la dose limite capable d'agglutiner une souche microbienne donnée dans des conditions bien précisées. On pourrait également chercher la dose capable d'agglutiner une souche donnée en un temps donné, dans des conditions bien précisées. Le titrage pourrait ainsi être réalisé en quelques minutes. Notons que la souche bactérienne utilisée dans l'expérience ci-dessus (*Clostridium sporogenes*) ne serait peut-être pas la meilleure pour de tels titrages, d'autres espèces, en effet, s'agglutinent plus rapidement ou forment des agrégats plus facilement visibles.

nation. Nos expériences ont confirmé cette prévision. Il suffit d'ajouter de l'acide ribonucléique à raison de 4 mg. par millilitre pour que l'agglutination ne s'effectue plus alors que la concentration en streptomycine est 1 mg. par millilitre. Notons que dans de telles proportions, l'excès d'acide ribonucléique empêche la précipitation des complexes streptomycine-acide ribonucléique. (*La dissolution de ces complexes dans l'excès d'acide ribonucléique n'avait pas été notée jusqu'ici.*)

L'action inhibitrice des acides ribonucléiques vis-à-vis de l'agglutination par la streptomycine n'est cependant pas un argument parfait en faveur de notre hypothèse sur le déterminisme de l'agglutination, car d'autres substances inhibent également l'agglutination : c'est le cas des peptones et des protéines (nos essais ont porté sur la cristallumine du sérum).

Enfin, nous avons montré ci-dessus le rôle primordial de l'antigène O contenu dans certaines bactéries. Nous avons donc recherché si un antigène O purifié pouvait, lui aussi, inhiber l'agglutination, et le résultat fut nettement positif. D'ailleurs, *il suffit du polyoside séparé de cet antigène pour inhiber l'agglutination.* Exemple : pour inhiber l'agglutination d'une suspension de *Clostridium sporogenes* par 1 mg. par millilitre de streptomycine, il suffit de 1 mg. par millilitre du polyoside purifié provenant de l'antigène O de *Salmonella typhi*. Ceci nous a amenés à chercher si le polyoside pouvait, indépendamment de toute cellule microbienne, inhiber la formation de complexes streptomycine-acide ribonucléique. Les résultats furent très nets : le précipité formé par 0.4 mg. par millilitre d'acide ribonucléique et 1 mg. par millilitre de streptomycine apparut très lentement (quinze minutes au lieu de quelques secondes) en présence de polyoside à raison de 0.8 mg. par millilitre, et fut beaucoup moins abondant qu'en l'absence du polyoside.

*Ce fait est général. Toutes les substances qui se sont montrées capables d'inhiber l'agglutination des bactéries par la streptomycine sont également capables d'inhiber la formation des complexes insolubles streptomycine-acide ribonucléique et vice versa,* c'est le cas pour les peptones et la cristallumine, par exemple. Au contraire, les substances de constitution voisine, mais qui n'inhibent pas l'agglutination bactérienne, n'agglutinent pas non plus la formation des complexes insolubles streptomycine-acide ribonucléique. C'est le cas des amino-acides, des oses et des mononucléotides.

Ce parallélisme d'action sur l'agglutination d'une part, et sur la formation des complexes insolubles entre streptomycine et acide ribonucléique est un argument très puissant en faveur de notre hypothèse. Il semble donc bien que l'agglutination par la streptomycine relève de la réaction entre l'antibiotique et les



nucléoprotéines des bactéries. D'autre part, l'absence d'agglutination chez les germes qui possèdent un antigène O peut être interprétée comme une inhibition par cet antigène de la réaction entre streptomycine et nucléoprotéines bactériennes (2).

**ACTION DU CHAUFFAGE SUR L'AGGLUTINATION DES BACTÉRIES PAR LA STREPTOMYCINE.** — Nous avons recherché si le chauffage préalable des bactéries à différentes températures modifiait leur agglutinabilité par la streptomycine.

Dans ce but, des suspensions de *Clostridium* en eau distillée, renfermant le même poids de bactéries par tube, étaient plongées dans un bain-marie à 100°, et on les retirait à différents instants en notant chaque fois à 1/2 degré près la température atteinte par l'émulsion microbienne. Après refroidissement, les suspensions étaient additionnées de streptomycine, puis placées au thermostat à 40° C. Voici les résultats obtenus dans cette expérience : le chauffage préalable des bactéries à 60° C ne modifie pas la vitesse d'agglutination par la streptomycine. Par contre, si la température de l'émulsion a atteint 65° C, l'agglutination se fait lentement et d'une manière incomplète. A partir de 70° C et au-dessus, les bactéries sont irréversiblement modifiées, puisqu'elles ne sont plus agglutinables (ceci est à rapprocher des résultats de Linz [41], qui a noté que les bactéries chauffées au-dessus de 65° C ne fixent plus la streptomycine).

On sait que certaines bactéries sont agglutinées par acidification à un pH convenable. On pouvait se demander si cette agglutination était à rapprocher (du point de vue de la sensibilité au chauffage) de celle que nous observons pour la streptomycine. L'étude du chauffage préalable différencie très nettement ces deux types d'agglutination, car le chauffage à 100° C des bactéries ne modifie pas leur agglutinabilité par les acides (*Clostridium sporogenes*), tandis qu'un chauffage même bien plus modéré (70° C) fait disparaître l'agglutinabilité par la streptomycine.

**AGGLUTINATION DES BACTÉRIES APRÈS TRAITEMENT PAR DIFFÉRENTS SOLVANTS ORGANIQUES.** — Dans un précédent travail, Rybak et Gros [23] ont montré que la streptomycine est susceptible de former des complexes insolubles avec divers lipides (céphaline, acides gras, etc.). L'antigène O, qui renferme des phosphatides, ne donne pas lieu, toutefois, à la formation de complexes. Puisque dans les cellules bactériennes il existe des quantités notables de lipides libres, nous avons recherché si des lipides bactériens intervenaient dans l'agglutination par la streptomycine. Pour cela,

(2) Notons que d'autres hypothèses sont possibles, nous les envisageons plus loin.

nous avons soumis des bactéries à une délipidation plus ou moins poussée, avant de les mettre en présence de streptomycine. Nos essais ont porté surtout sur *Clostridium sporogenes*. Dans une première série d'expériences, les bactéries furent traitées à la température ordinaire, par un mélange d'acétone et d'éther, ou bien par un mélange de méthylal et d'éther. Après l'élimination des solvants par évaporation dans le vide, les bactéries furent mises en suspension dans de l'eau distillée et l'on essaya l'agglutination par la streptomycine. L'agglutination se réalise encore, mais elle est très retardée, puisqu'elle n'a lieu qu'après environ dix heures à + 40° C. Un simple traitement des bactéries par l'alcool à la température ordinaire conduit au même résultat. Mais les techniques de délipidation employées ici sont imparfaites, car : 1° elles n'enlèvent pas rigoureusement tous les lipides et, 2° elles dénaturent plus ou moins profondément les protéines. Nous avons donc repris les expériences en utilisant la méthode de délipidation que Delsal [24] a préconisée pour la délipidation des protéines du sérum (3). Les bactéries furent traitées simplement par de l'éther très refroidi, contenant 10 p. 100 d'alcool : on porta le mélange à — 75° C, puis on le laissa se réchauffer jusqu'à 0° C et on renouvela le refroidissement à — 75° C. Ces variations de température furent répétées plusieurs fois en changeant l'éther, sans jamais laisser la température s'élever au-dessus de 0° C. Dans ces conditions, la dénaturation des protéines doit être aussi minime que possible et la délipidation est au moins aussi bonne que par les autres méthodes. Mais il reste, ici aussi, de petites quantités de phosphatides qui ne pourraient être arrachées que par des méthodes qui dénaturent profondément les protéines.

*Les bactéries délipidées par la technique de Delsal sont agglutinées lentement par la streptomycine, comme celles traitées par les précédentes techniques de délipidation plus brutales. Il ne semble donc pas que les lipides soient indispensables à l'agglutination, mais ils jouent probablement un rôle favorisant.*

Remarquons enfin que les souches microbiennes non agglutinables par la streptomycine ne le deviennent pas davantage par délipidation (technique de Hardy-Gardiner, expériences réalisées sur *Phytomonas tumefaciens*, souche Smooth, donc ayant un antigène O). Mais notons que la délipidation n'enlève pas l'antigène O.

Rapprochons ces faits des observations très anciennes de Douglas et Flemming [25] qui, dès 1921, notèrent que la délipidation

(3) Le procédé de délipidation selon Hardy et Gardiner a été utilisé également dans ces expériences ; il nous a conduits aux mêmes résultats.

des bactéries retarde leur agglutination par les agglutinines des antisérums.

Rappelons enfin que Linz [41] a observé que les bactéries traitées par le chloroforme absorbent moins de streptomycine que les mêmes bactéries intactes.

RAPPORTS ENTRE L'AGGLUTINABILITÉ ET LA SENSIBILITÉ A L'ANTIBIOTIQUE. — Nous avons vu que de nombreuses bactéries à Gram-négatif ne sont pas agglutinées par la streptomycine (présence d'antigène O). Or, ces mêmes bactéries sont sensibles à l'action antibiotique de la streptomycine. L'agglutinabilité et la sensibilité à l'antibiotique ne sont pas liées d'une façon absolue.

Nous avons confirmé ce fait en étudiant deux souches d'une même espèce (*Staphylococcus aureus*) qui sont, l'une très sensible à l'action antibiotique (0,5  $\mu$ g. par millilitre) et l'autre très peu sensible à cette action (50.000  $\mu$ g. par millilitre). Ces deux souches sont agglutinées aussi rapidement et aussi bien l'une que l'autre.

On peut conclure que la transformation qui rend résistante la bactérie ne s'accompagne pas d'une modification de l'agglutination.

Agglutination et sensibilité à l'antibiotique sont peut-être cependant deux phénomènes en partie régis par des conditions similaires. La combinaison de la streptomycine avec l'acide ribonucléique est probablement un facteur commun.

En faveur de cela, citons une de nos observations : les souches R et S d'une même espèce *Salmonella typhi* présentent des sensibilités très différentes à la streptomycine et la souche R qui est agglutinable est sensible à une dose *cinq fois moindre* que celle qui est nécessaire pour inhiber la culture de la souche S. *Il semble donc bien que l'antigène O, qui inhibe l'agglutination, gêne aussi l'action antibiotique de la streptomycine.*

SUBSTANCES APPARENTÉES A LA STREPTOMYCINE ET DÉRIVÉS POSÉDANT UN POUVOIR AGGLUTINANT (dihydrostreptomycine et acide streptomycinique). — Avant d'exposer nos hypothèses sur l'interprétation du mécanisme de l'agglutination des bactéries par la streptomycine, nous allons envisager si les dérivés plus ou moins immédiats de cette substance jouissent également de propriétés agglutinantes semblables.

*La dihydrostreptomycine et l'acide streptomycinique (4) se comportent en tous points comme la streptomycine : à molarités égales, ils agglutinent les mêmes espèces bactériennes et dans les*

(4) Le Docteur Fried a eu l'obligeance de nous envoyer la dihydrostreptomycine et l'acide streptomycinique ; nous tenons à l'en remercier bien vivement.



mêmes temps que la streptomycine. Le sulfate d'arcaïne (tétraméthylène diguanidine) possède un pouvoir agglutinant plus faible que la streptomycine, mais assez net cependant. Ce fait revêt une certaine importance parce que la streptomycine comporte dans sa molécule deux groupements guanidiques disposés en position méta, sur un noyau aromatique. Notons enfin que la guanidine et la créatine (acide méthyl-guanidinoacétique) sont dépourvues d'effets agglutinants.

En résumé :

1° L'intégralité du groupe carbonyle du streptose (pentose présent dans la streptobiosamine) n'est pas indispensable pour assurer à la streptomycine un pouvoir agglutinant, puisque l'hydrogénation (dihydrostreptomycine) ou l'oxydation (acide streptomycinique) de cette fonction ne modifient pas les propriétés agglutinantes de la streptomycine.

2° Le pouvoir agglutinant de la streptomycine semble en partie dévolu à ses deux groupements guanidiques (les dérivés monoguanidiques étant au contraire inactifs) puisque l'arcaïne présente déjà une certaine action agglutinante. Cette action des dérivés diguanidiques linéaires est faible cependant. Le pouvoir agglutinant de la streptomycine serait donc supporté par ses deux groupements guanidiques associés à une certaine configuration cyclique de la molécule (5).

INTERPRÉTATION DU MÉCANISME DE L'AGGLUTINATION DES BACTÉRIES PAR LA STREPTOMYCINE. — A. *Réaction de la streptomycine avec les groupes SH des protéines microbiennes.* — A la suite de ses résultats relatifs à la dénaturation rapide de la streptomycine par des aminoacides ou des peptides soufrés, Cavallito [26] a pensé que l'affinité de la streptomycine pour les groupements SH libres des cellules microbiennes pouvait expliquer l'action antibiotique de cette substance. Signalons en particulier que pour Linz [41], la fixation de la streptomycine sur les bactéries pourrait relever d'une combinaison streptomycine-groupements SH libres de protéines microbiennes. On sait néanmoins, depuis les travaux de Fried et collaborateurs [27], que la déhydrostreptomycine, produit de la réduction catalytique de la streptomycine, n'est pas inactivable par la cystéine ou les dipeptides qui renferment de la cystéine et que, cependant, son activité antibiotique est à peu près identique à celle de la streptomycine.

On est donc déjà obligé d'admettre que les groupes SH ont

(5) Nous tenons à remercier ici E. Bricas, à qui nous sommes redevables de l'arcaïne et d'importantes suggestions pour cette partie de notre travail. Des recherches sur la biochimie des dérivés diguanidiques sont actuellement en cours au laboratoire avec Bricas.

un rôle secondaire dans le mécanisme de l'action antibiotique de la streptomycine, si toutefois ils en ont un.

Néanmoins, comme nous venons de voir que le pouvoir agglutinant de la streptomycine paraît indépendant de son action antibiotique, il était nécessaire de poser à nouveau le problème dans le cas de l'agglutination. Le phénomène d'agglutination observé quand on mélange la streptomycine à des suspensions de certaines espèces microbiennes peut-il être imputé à une fixation de l'antibiotique sur des groupes SH protéiques de ces bactéries ? On pouvait y songer, car *la cystéine M/100 empêche l'agglutination du Clostridium par la streptomycine*. Mais la dihydrostreptomycine qui, contrairement à la streptomycine, est dépourvue d'affinité pour les groupements SH (6, 7) est douée, comme nous venons de le constater, d'un pouvoir agglutinant en tous points comparable à celui de la streptomycine. *D'ailleurs la cystéine M/100 n'empêche pas l'agglutination du Clostridium sporogenes par la dihydrostreptomycine*.

L'action inhibitrice de la cystéine sur le pouvoir agglutinant de la streptomycine est donc due à une dénaturation chimique de l'antibiotique. L'action agglutinante de la streptomycine elle-même ne peut donc être imputable à une saturation de groupes SH libres de protéines microbiennes.

COMBINAISON ENTRE LA STREPTOMYCINE ET LES NUCLÉOPROTÉINES MICROBIENNES. — Il est logique d'admettre que l'agglutinabilité des bactéries par la streptomycine dépend de leur texture superficielle. On sait que, en dehors des formes bactériennes qui comportent un antigène O périphérique, les cellules microbiennes Gram + ont leur surface cytoplasmique constituée par une ribo-

(6) L'emploi de la dihydrostreptomycine dans les expériences de fixation sur les bactéries, du genre de celles que Linz a réalisées, permettrait probablement de confirmer que les groupes SH n'interviennent pas plus dans la fixation de l'antibiotique par les bactéries que dans leur agglutination.

(7) Fried [27] ayant déjà signalé que la dihydrostreptomycine n'était pas inactivable par la cystéine dans les conditions où la streptomycine est dénaturée, on pouvait penser que la dihydrostreptomycine était dépourvue d'affinité pour les groupes SH de la cystéine. Nous en avons apporté la démonstration par les expériences suivantes :

1° Si l'on additionne la cystéine de streptomycine en quantités suffisantes on ne peut révéler aucun groupement SH libre par dosage au moyen d'acide monoiodoacétique suivant la méthode de Rosner [28].

2° Si la même quantité de cystéine est mise en présence de dihydrostreptomycine à molarité égale à celle où la streptomycine agissait précédemment, le titrage révèle autant de groupements SH libres que si la dihydrostreptomycine était absente. La dihydrostreptomycine ne masque donc pas les groupes SH de la cystéine.

nucléoprotéine associée à des polysaccharides et à des lipides ; peut-être existe-t-il dans ce cas, comme dans les formes Smooth des *Salmonellas*, une association lipido-glucidique. Mais toujours est-il, cependant, que quels que soient les procédés d'extraction mis en œuvre, on ne parvient pas à isoler les constituants lipidiques et glucidiques sous forme d'un complexe analogue à l'antigène O. Il est donc raisonnable de penser, dans le cadre actuel de nos connaissances, que chez les microbes à Gram positif, la cellule est limitée par une couche comportant une ribonucléoprotéine en contact plus ou moins direct avec le milieu ambiant, tandis que chez les formes S du groupe des *Salmonellas* et de quelques autres espèces à Gram négatif (*Vibrio*, *pseudomonas aeruginosa*, etc.), la ribonucléoprotéine cytoplasmique est protégée du milieu ambiant par une gaine d'un, ou mieux, de plusieurs antigènes somatiques. Quant à la constitution de la couche limitante des cellules bactériennes Gram négatif du type R, elle est encore mal connue (8). L'absence de caractère Gram + chez ces formes n'empêche pas de penser qu'elles renferment de l'acide ribonucléique localisé en couche périphérique. Si l'on envisage qu'une suspension de cellules microbiennes appartenant à des espèces dépourvues d'antigène O (exemple : bactéries à Gram positif en général) est mise en présence de streptomycine, on doit penser que les molécules de cette substance réagissent avec l'acide ribonucléique du cytoplasme. On sait, en effet, que la streptomycine et l'acide ribonucléique ont une grande affinité l'un pour l'autre puisqu'ils sont susceptibles de former *in vitro* des combinaisons insolubles. Peut-être qu'en se fixant sur la ribonucléoprotéine cytoplasmique des microbes à Gram positif, la streptomycine entraîne une *modification de la charge et de la texture des cellules microbiennes*, ce qui rendrait instables les suspensions de ces cellules. Tout se passerait comme si l'on mettait en présence la streptomycine avec une nucléoprotéine géante, la cellule microbienne : il en résulterait une floculation. Rien n'empêche de penser qu'un mécanisme analogue intervient dans l'agglutination des formes R des bactéries à Gram négatif. Cependant, des études complémentaires sur la cytochimie de ces bactéries sont nécessaires pour nous permettre de généraliser notre conception du mécanisme de l'agglutination, à toutes les bactéries Gram + et Gram —. Comment expliquer la résistance des formes antigéniques de type S à l'agglutination par la streptomycine ? Deux hypothèses sont plausibles :

1° L'antigène O inhibe la réaction entre streptomycine et acide ribonucléique. En faveur de cette hypothèse, nous avons montré :

(8) Notons que malgré la perte de l'antigène O les variétés R des bactéries à Gram négatif n'acquièrent pas le caractère Gram +.



1° que le polyoside de l'antigène O inhibe *in vitro* la formation de précipité streptomycine-acide nucléique ; 2° que le polyoside inhibe l'agglutination.

2° L'antigène O (qui, nous l'avons observé, ne forme pas de complexes insolubles avec la streptomycine) laisserait passer celle-ci et la réaction avec les acides nucléiques sous-jacents serait possible. Mais la combinaison étant effectuée à l'intérieur de la gaine antigénique, la charge et la texture superficielle de la cellule seraient respectées et la suspension microbienne demeurerait stable.

Bien que ces deux hypothèses ne s'excluent pas, la première semble plus satisfaisante. Quoi qu'il en soit, l'hypothèse d'une combinaison entre la streptomycine et la ribonucléoprotéine cytoplasmique, comme base d'interprétation de l'agglutination des bactéries par la streptomycine, rend parfaitement compte de l'action des électrolytes ou de certaines molécules sur cette agglutination.

On sait, en effet, que les sels empêchent, à des degrés divers, la formation de complexes entre la streptomycine et l'acide ribonucléique [20, 21, 22, 29, 30, 31, 32]. Nous avons vu qu'il en était de même pour diverses substances à poids moléculaire élevé (peptones, albumines, polyosides de l'antigène O). Par ailleurs, Von Euler a montré récemment [33] que la streptomycine dénaturée par la cystéine ne formait plus de complexes avec l'acide ribonucléique et nous voyons qu'en présence de cystéine, la streptomycine n'agglutine pas les bactéries.

En somme, l'agglutination des bactéries par la streptomycine pourrait, à notre sens, permettre d'obtenir quelques renseignements sur la localisation des constituants ribonucléoprotéiques dans la cellule. Rappelons que S. S. Cohen, étudiant la précipitation des virus par la streptomycine, pense que cette précipitation pourrait permettre de connaître la localisation et l'orientation de l'acide désoxyribonucléique chez les différents virus.

COMPARAISON DE L'AGGLUTINATION PAR LA STREPTOMYCINE AVEC L'AGGLUTINATION PAR LA TRYPAFLAVINE. — On sait que la trypaflavine est utilisée pour différencier par agglutination les variantes R et S des *Salmonellas* car elle n'agglutine généralement pas les souches S, mais agglutine les souches R. Il était intéressant de comparer les agglutinations par la trypaflavine et par la streptomycine.

La trypaflavine agglutine les bactéries *en présence de sels* [35, 36] et forme alors des grumeaux gros et non dissociables par agitation. Elle agglutine également en l'absence de sels, mais on n'observe alors que des grumeaux très fins et facilement dissociables semblables, en somme, à ceux que donne la streptomycine.

La streptomycine *n'agglutine pas en présence de sels* et, de plus, si l'on ajoute du NaCl dans l'eau distillée où a eu lieu une agglutination de manière que le milieu devienne M/1 en ClNa, on voit les grumeaux disparaître. La streptomycine est alors éluee [41, 22]. Dans le cas de la trypaflavine, les sels ne libèrent pas l'agent agglutinant et *favorisent* au contraire la formation de gros grumeaux.

La trypaflavine agglutine encore certaines souches de *coli* renfermant encore des quantités notables d'antigène O et elle agglutine aussi certaines souches de *Salmonella abortus*, dans certaines phases de leur évolution dites «  $\beta$  », bien que l'antigène O soit présent. Dans un travail précédent [37], nous avons montré que la trypaflavine et la thymonucléohistane de veau donnent lieu à la formation de complexes avec l'antigène O. La thymonucléohistane agglutine les bactéries de type S et R [38]. La streptomycine semble un agent agglutinant plus spécifique, car elle ne précipite pas l'antigène O. Il serait intéressant de voir si la streptomycine est un moyen plus fidèle.

#### RÉSUMÉ.

Les suspensions de nombreuses souches bactériennes dans l'eau distillée sont agglutinées par la streptomycine. Les électrolytes empêchent cette agglutination; ceci explique qu'elle n'ait pas été observée jusqu'ici.

Les seules souches bactériennes qui ne sont pas agglutinées sont celles qui possèdent un antigène somatique O (souches S des bactéries du groupe *Salmonella-coli*). D'ailleurs les antigènes O extraits de ces bactéries inhibent l'agglutination des souches agglutinables. Pour inhiber cette agglutination, il suffit même des polyosides extraits des antigènes O. La résistance à l'agglutination des souches S des *Salmonelles* doit donc être due aux antigènes somatiques O qu'elles contiennent.

Il n'y a pas, semble-t-il, de relation directe entre l'agglutinabilité et la sensibilité des espèces à l'action antibiotique de la streptomycine, car certaines espèces sensibles ne sont pas agglutinées. Mais agglutination et sensibilité à l'antibiotique doivent être en partie régies par des conditions similaires. En effet, les souches R et S d'une même espèce de *Salmonella* présentent des sensibilités très différentes à la streptomycine : la souche R (agglutinable) est sensible à une dose cinq fois moindre que celle qui est nécessaire pour inhiber la culture de la souche S (non agglutinable et possédant un antigène O). Il semble donc que l'antigène O qui inhibe l'agglutination gêne aussi l'action antibiotique de la streptomycine.

L'agglutination par la streptomycine n'a pas lieu si l'on opère

en présence d'acide ribonucléique, et elle est inhibée par toutes les substances qui inhibent la formation *in vitro* de complexes insolubles entre la streptomycine et l'acide ribonucléique (sels, peptones, protéines, cystéine, excès d'acide ribonucléique, etc.). De plus, les bactéries préalablement agglutinées par la streptomycine se remettent en suspension homogène si l'on ajoute au milieu des électrolytes à la concentration capable de provoquer *in vitro* la dissolution des complexes insolubles acide nucléique-streptomycine. Il est en tout cas vraisemblable que l'agglutination est liée à une combinaison entre la streptomycine et l'acide ribonucléique cytoplasmique de la bactérie, surtout dans le cas des bactéries à Gram positif qui renferment un complexe ribonucléique de localisation périphérique.

Les groupes SH des constituants bactériens ne semblent pas intervenir dans l'agglutination, car la dihydrostreptomycine agglutine aussi bien que la streptomycine elle-même et son action n'est pas inhibée par la cystéine. Il est possible que les lipides libres des bactéries, grâce à leur affinité pour la streptomycine, jouent un rôle dans la fixation de cette substance par les bactéries et dès lors dans l'agglutination qu'elle entraîne ; ce rôle ne serait que favorisateur et non pas prépondérant. On peut attribuer l'activité agglutinante de la streptomycine à ses deux groupements guanidiques (disposés en méta sur un même cycle aromatique). En effet, l'arcaïne (tétraméthyl-diguanidine) possède un pouvoir agglutinant net pour les souches bactériennes agglutinables par la streptomycine. La guanidine et la créatine, qui ne possèdent chacune qu'un seul groupement guanidique, sont dépourvues d'effet agglutinant.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 242.
- [2] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 736.
- [3] MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 161.
- [4] HENRY (J.), HENRY (R. J.), HOUSEWRIGHT, BERKMAN. *J. Bact.*, 1948, **56**, 527.
- [5] LEVADITI et HENRY. *Rev. Immunol.*, 1947, **11**, 22.
- [6] LEVADITI et HENRY. *Rev. Immunol.*, 1948, **12**, 193.
- [7] PRICE, RANDALL, CHANDLER, REEDY. *J. Bact.*, 1947, **53**, 481.
- [8] STRAUSS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **64**, 97.
- [9] TULASNE, VENDRELY, MINCK. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **142**, 1012.
- [10] KELLENBERGER. *Experientia*, 1948, **4**, 440.
- [11] LINZ. « Contribution à l'étude du mécanisme d'action de la streptomycine » (Gembloux) Belgique.
- [12] WAKSMAN et SCHATZ. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1945, **34**, 233.
- [13] HAMRE, RAKE, DONOVICK. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **62**, 25.
- [14] KLEIN et KLIMMELMANN. *J. Bact.*, 1946, **52**, 471.



- [15] SMITH et WAKSMAN. *J. Bact.*, 1947, **64**, 67 et 253.
- [16] MIDDLEBROOK et YEGIAN. *Am. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 553.
- [17] GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947 **141**, 360.
- [18] GROS (F.), MACHEBOEUF (M.), LACAILLE (P.), RYBAK (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 718.
- [19] COHEN (S. S.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **168**, 511.
- [20] GROS (F.), RYBAK, MACHEBOEUF (M.), RAMBECH. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1550.
- [21] GROS (F.), RYBAK (B.). *Helv. Chim. Acta*, 1948, **31**, 1853.
- [22] BERKMANN, HENRY, HOUSEWRIGHT, HENRY. *J. Bact.*, 1947, **54**, 6.
- [23] RYBAK (B.) et GROS (F.). *Experientia*, 1948, **4**, 346.
- [24] DELSAL. (Communication personnelle.)
- [25] DOUGLAS et FLEMMING. *Brit. J. exp. Path.*, 1921, **2**, 131.
- [26] CAVALLITO. *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 29.
- [27] FRIED et WINTERSTEINER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 79.
- [28] ROSNER. *J. Biol. Chem.*, 1940, **132**, 657.
- [29] LOO et coll. *J. Bact.*, 1945, **50**, 701.
- [30] BERKMAN, HENRY, HOUSEWRIGHT. *J. Bact.*, 1947, **53**, 567.
- [31] QUAN. *J. Bact.*, 1948, **55**, 25.
- [32] RYBAK (B.), GRUMBACH (F.), GROS (F.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 237.
- [33] VON EULER et HELLER. *Ark. fur Kemi.*, 1948, **26 A**, n° 14.
- [34] ALESSANDRINI et SABATUCCI. *Ann. d'Igiene*, 1932, **41**, 29.
- [35] PAMPANA. *J. Hyg.*, 1933, **33**, 402.
- [36] MESROBEANU LYDIA, *Thèse Paris*, 1936.
- [37] RYBAK, GROS et GRUMBACH. *Ces Annales*, 1949, **77**, 148.
- [38] RYBAK. *Ces Annales*, 1948, **75**, 351.

# ACTIVITÉ COMPARÉE DE LA PÉNICILLINE SUR LA CROISSANCE DE *BACILLUS SUBTILIS* EN MILIEU SYNTHÉTIQUE AMMONIACAL ET EN MILIEU PEPTONÉ

par N. GRELET (\*)

(Centre National de la Pénicilline.)

Les travaux de E. F. Gale et ses collaborateurs [3, 4, 5] ont montré que la pénicilline empêche l'assimilation de l'acide glutamique par *Staphylococcus aureus* et que, par contre, une souche de *St. aureus*, accoutumée à 6.000 unités/cm<sup>3</sup>, et devenue Gram-négative, a perdu le pouvoir d'assimiler l'acide glutamique, mais a acquis celui de synthétiser tous les acides aminés.

E. F. Gale réserve expressément la question de savoir si cette action de la pénicilline sur l'assimilation de l'acide glutamique est cause ou effet de l'activité bactériostatique et bactériolytique.

Nous avons donc cherché à savoir si une souche réputée sensible est capable de croître en milieu synthétique en absence d'acides aminés ; et, au cas où elle y croîtrait, si sa sensibilité y est modifiée.

Dans toute la bibliographie que nous avons faite, nous n'avons trouvé sur la sensibilité en milieu synthétique qu'un travail de G. Schwartzman (1946) [8] consacré à la résistance des bactéries Gram-négatives : plusieurs souches de *Escherichia coli* et de *Salmonella* sont plus sensibles en milieu synthétique privé d'acides aminés, qu'en bouillon de viande ; par exemple, la croissance de *E. coli* est empêchée par 1 unité/cm<sup>3</sup> en milieu synthétique, et par 20 unités/cm<sup>3</sup> en bouillon. Toutefois, G. Schwartzman observe que de nombreux passages ultérieurs sur milieu synthétique élèvent la résistance : par exemple, la concentration minima inhibitrice passe de 1 à 2,25 unités/cm<sup>3</sup>.

Bien qu'il suffise d'un cas de sensibilité à la pénicilline en milieu synthétique, fût-ce avec un organisme Gram-négatif peu sensible, pour que le mode d'action de l'antibiotique ne puisse

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juin 1949.

être expliqué par son seul effet sur l'assimilation des acides aminés, nous avons refait quelques essais avec diverses souches de *Bacillus subtilis*.

#### TECHNIQUES.

Nous rapporterons les expériences faites avec une souche sensible de *B. subtilis*, désignée par S 1 (1). Cette souche s'étant dissociée, nous avons isolé et utilisé le variant rugueux. Deux milieux ont été préparés, différant par la source d'azote, ammoniacale ou peptone :

Pour 1 litre d'eau du robinet :

	GRAMMES
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ . . . . .	5,0
$\text{SO}_4\text{Mg}$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,25
$\text{SO}_4\text{Mn}$ , 4 $\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,02
$(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ , 6 $\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0,02
$\text{ClNH}_4$ ou peptone (ÜCLAF) . . . . .	5,0
Glucose (RAL, solution 10 p.100, ajoutée après stérilisation). . . . .	20,0

pH : ajusté à 7,0 avant stérilisation, descendu à 6,7 après stérilisation.

On additionne stérilement dans un tube 5 cm<sup>3</sup> de ces milieux et 1 cm<sup>3</sup> d'eau ou de dilutions de pénicilline.

Les cultures sont faites à 37°, dans des tubes du diamètre de 19 mm., placés sur un appareil à secousses pour éviter la formation prématurée d'un voile, et assurer l'homogénéité de la suspension bactérienne. L'opacité de la culture est mesurée dans le tube avec l'électrospectrophotomètre Coleman à 700 m $\mu$ . Exprimée en densité optique, elle peut être considérée comme proportionnelle à la densité bactérienne dans la phase de croissance exponentielle qui se prolonge jusqu'à densité optique 0,20.

Nous caractérisons les courbes de croissance par l'heure du passage à la densité 0,080 et par la durée qui s'écoule entre les densités 0,040 et 0,080, c'est-à-dire la durée moyenne de l'intervalle entre deux divisions. La densité optique 0,080 (83,5 p. 100 de la transmission totale) correspond à environ 10 millions de germes par centimètre cube.

La pénicilline utilisée est la « spécilline G » de Rhône-Poulenc.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

1° CULTURES A PARTIR DE DEUX TAUX D'ENSEMENCEMENT VARIANT COMME 1 ET 100.

La souche utilisée de *B. subtilis* (comme diverses autres souches,

(1) Nous devons cette souche au laboratoire du professeur W. H. Peterson (U. of Wisconsin-Madison-Wisc.), à qui nous exprimons ici nos remerciements.



que nous avons essayées) peut être cultivée sur le milieu synthétique ammoniacal, et y subir un nombre de passages indéfini.

D'une culture jeune en milieu ammoniacal (deuxième passage) nous avons ensemencé, en milieu ammoniacal et en milieu peptoné, soit : 180.000, soit : 1.800 germes par centimètre cube, en présence de quantités variables de pénicilline (tableau I).

TABLEAU I. — **Activité de la pénicilline en milieu ammoniacal et en milieu peptoné en relation avec le taux d'ensemencement de *Bacillus subtilis*.**

PÉNICILLINE unités par centimètre cube	HEURE DU PASSAGE A DENSITÉ OPTIQUE 0,080 (environ 10 millions de germes par centimètre cube)			
	Ensemencement : 180.000 germes par centimètre cube		Ensemencement : 1.800 germes par centimètre cube	
	Milieu ammoniacal	Milieu peptoné	Milieu ammoniacal	Milieu peptoné
166 . . . . .	Pas de croissance.	48 1/2	Pas de croissance.	Pas de croissance.
33 . . . . .	39	18 1/2	»	»
6,7 . . . . .	29	13	»	»
1,3 . . . . .	20 1/2	10	»	»
0,27 . . . . .	12	6 1/2	»	»
0,053 . . . . .	9	4	»	»
0,011 . . . . .	8	3 1/2	»	12
0,002 . . . . .	8	3 1/2	22	6 1/2
0,000 . . . . .	8	3 1/2	20 1/2	6 1/2

En absence de pénicilline, l'intervalle entre deux divisions est compris entre 90 et 110' en milieu synthétique, entre 30 et 40' en milieu peptoné ; l'ensemencement ayant été fait avec une culture en croissance exponentielle, il n'y a pas de temps de latence notable.

Les milieux ensemencés au taux le plus élevé permettent presque tous une culture, mais après des temps de latence d'autant plus considérables qu'il y a plus de pénicilline. Les vitesses de croissance sont peu diminuées par la pénicilline ; par exemple, en milieu peptoné, l'intervalle entre deux divisions passe de 40' sans pénicilline à 60' en présence de 166 unités/cm<sup>3</sup> de pénicilline, mais il y a alors une latence de quarante heures environ.

Il faut l'ensemencement au taux le plus bas pour que la sensibilité de la souche apparaisse nettement : 0,011 unités/cm<sup>3</sup> en milieu synthétique et 0,053 unités/cm<sup>3</sup> en milieu peptoné, empêchent toute culture (jusqu'à quarante-trois heures). La souche de *Bacillus subtilis* est donc sensible à la pénicilline en milieu synthétique, un peu plus même, qu'en milieu peptoné.

## 2° ACTION IMMÉDIATE DE LA PÉNICILLINE SUR UNE CULTURE DÉJÀ DÉVELOPPÉE.

Nous avons cherché à savoir ce qui peut se produire pendant les temps de latence observés en présence de pénicilline.

Pour cela, nous faisons agir la pénicilline dans le cas d'un

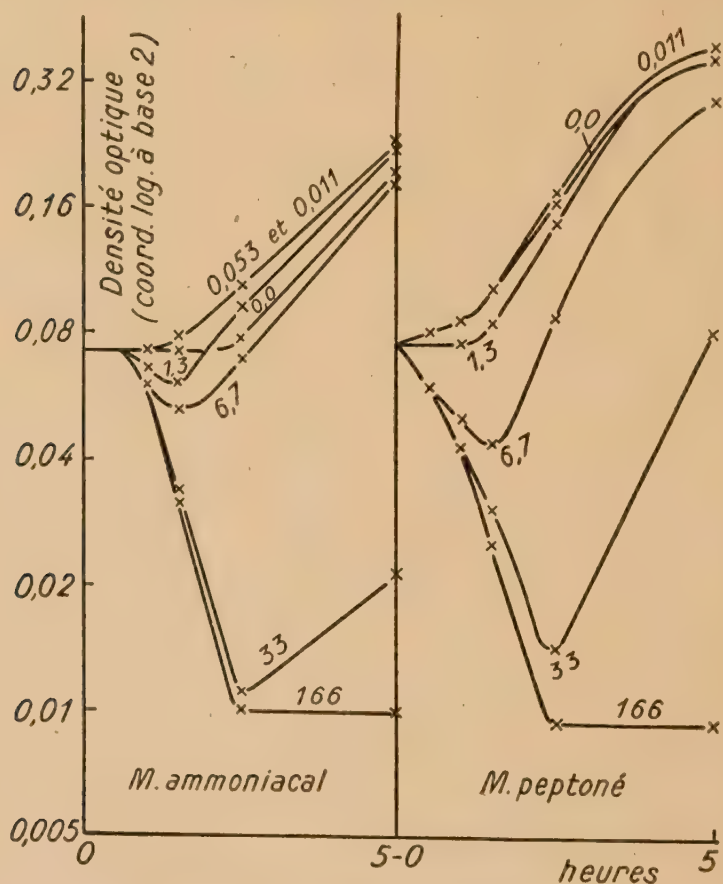


FIG. 1. — Action immédiate de la pénicilline sur une culture déjà développée. La densité optique 0 est celle de l'eau distillée; les densités mesurées n'ont pas été corrigées de la densité propre aux milieux, qui est là peu près égale à la densité des cultures lysées, soit environ : 0,010.

Les nombres indiqués sur chaque courbe représentent les teneurs initiales en pénicilline exprimées en unités par centimètre cube.

ensemencement tel que la culture présente, d'emblée, un trouble mesurable à l'électrophotomètre Coleman.

Pratiquement, une culture en milieu synthétique ammoniacal,

dans un Erlenmeyer de 500, est agitée pendant vingt et une heures à 37°.

On répartit alors dans les tubes Coleman : 2 cm<sup>3</sup> de cette culture, 3 cm<sup>3</sup> de milieu neuf ammoniacal ou peptoné, et 1 cm<sup>3</sup> d'eau ou de dilutions de pénicilline. La densité optique à l'appareil Coleman (700 mμ) est alors de 0,070. On suit cette densité pendant les cinq premières demi-heures, puis à cinq heures (fig. 1).

Les courbes de croissance et de lyse sont semblables en milieu ammoniacal seul, et en milieu ammoniacal et peptoné, à cela près que la vitesse de croissance est plus élevée en présence de peptone.

Pour les concentrations égales ou supérieures à 1,3 unité/cm<sup>3</sup>, il y a une lyse suivie plus ou moins tardivement d'une repousse : même les tubes contenant 833 unités/cm<sup>3</sup> ont été retrouvés deux jours après avec un voile ; aucune concentration utilisée n'a donc détruit tous les germes.

Avec 0,27 unité/cm<sup>3</sup>, il y a une bactériostase brève, d'environ une heure et demie. Avec 0,053 et 0,011, le retard initial de la croissance est faible ou nul par rapport à la concentration zéro, et on observe même une légère accélération de la croissance vers deux heures et demie : cette accélération de la croissance par de faibles concentrations de pénicilline, que nous avons notée d'autres fois, et qui est ici nette surtout dans le milieu synthétique, mérite confirmation.

Dans la limite de la durée de cette expérience, et du nombre de points que nous avons relevés, la vitesse de croissance des cultures au voisinage de la densité optique 0,080 ne paraît pas influencée par la concentration initiale de pénicilline : avec 33 unités/cm<sup>3</sup> par exemple, les cultures après une lyse accentuée repartent sensiblement à la même vitesse que les cultures sans pénicilline.

#### DISCUSSION.

Les courbes que nous donnons ici ne s'éloignent pas de celles qui ont été données fréquemment pour le Staphylocoque et le Streptocoque [1, 2, 6, 7, 9].

Notons toutefois que Hobby et Dawson (1944) [6] ont constaté que l'effet de la pénicilline varie avec le taux de croissance du germe : ici, la pénicilline s'est révélée aussi active, sinon un peu plus, dans le milieu synthétique que dans le milieu peptoné, malgré la croissance plus rapide dans ce dernier milieu.

#### CONCLUSIONS.

La souche pénicillino-sensible de *Bacillus subtilis* étudiée peut être cultivée en milieu synthétique ammoniacal. Sa sensibilité à la pénicilline est la même en milieu ammoniacal et en milieu peptoné.



Le mode d'action de la pénicilline ne peut donc être expliqué dans tous les cas par l'inhibition qu'elle exerce — comme E. F. Gale et ses collaborateurs l'ont démontré avec *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus fecalis* — sur l'assimilation de l'acide glutamique par les germes Gram-positifs.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONÉT-MAURY (P.) et PERAULT (R.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 135-139.
- [2] CHAIN (E.) et DUTHIE (E. S.). *Lancet*, 1945, **248**, 652-657.
- [3] GALE (E. F.) et TAYLOR (E. S.). *J. gen. Microbiol.*, 1947, **1**, 314-326.
- [4] GALE (E. F.) et RODWELL (A. W.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 161-168.
- [5] GALE (E. F.). *Bull. John Hopkins Hosp.*, 1948, **83**, 119-175.
- [6] HOBBY (G. L.) et DAWSON (M. H.). *Procecd. Soc. exp. Biol. Med.*, 1944, **56**, 178-181 et 181-184.
- [7] NITTI (F.), FOSSAERT (J.) et FAGUET (M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 80-85.
- [8] SCHWARTZMAN (G.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 65-88.
- [9] WELSCH (M.). *C. R. Soc. biol.*, 1947, **141**, 436-438.

## L'INFECTION A *SALMONELLA BLEGDAM*

### IDENTIFICATION DU GERME; SON INCIDENCE A CHANGHAI ET EN EXTRÊME-ORIENT; ASPECT CLINIQUE

par J. FOURNIER

(Institut Pasteur de Changhaï, Chine.)

*Salmonella blegdam* est un des 22 types actuellement réunis dans le groupe D du tableau de Kauffmann-White [7], tableau où les salmonelles sont classées d'après leur constitution antigénique. Sa formule est « IX. XII : *g*, *m*, *o*, *q*, *z*<sup>1</sup> ».

La mise en évidence de l'antigène somatique IX, qui entraîne le diagnostic de groupe, se fait sans difficulté à l'aide d'un O-sérum Eberth-W saturé avec des souches *Para A* et *Para B*.

L'analyse de son complexe H est plus laborieuse. Remarquons tout d'abord qu'il s'agit d'une salmonelle monophasique. Peut-être est-il plus exact de dire que nous ne connaissons qu'une seule phase de cette salmonelle. Ce caractère est commun à 7 types du groupe D : *S. berta*, *S. enteritidis* (= B. de Gärtner), *S. blegdam*, *S. pensacola*, *S. dublin* (Kiel), *S. rostock* et *S. moscow*. Un autre caractère commun à ces 7 types est la présence de l'antigène *g*; si bien qu'on considère parfois ces 7 types comme les variantes d'une espèce unique, le B. de Gärtner. Quoi qu'il en soit, dans l'état actuel de nos connaissances, une salmonelle du groupe D qui ne possède pas de phase non spécifique ni de phase  $\beta$  et dont les suspensions H sont agglutinées par tous les immunsérums contenant l'agglutinine *g* (immunsérums *derby*, *montevideo*, *senftenberg*...) doit être rattachée à l'un de ces 7 types. Le diagnostic se ramène donc à la recherche séparée des antigènes *f*, *m*, *o*, *p*, *q*, *t*, *u*, *z*<sup>1</sup>, *z*<sup>2</sup> et *z*<sup>3</sup>, qui sont les seuls actuellement connus comme susceptibles de coexister avec l'antigène *g* dans le complexe H de ces 7 salmonelles.

En 1942, nous avons exposé une technique [4] qui nous a donné satisfaction et qu'avant nous P. Y. Liu [41] a utilisée à Pékin. Le tableau I ci-dessous indique les immunsérums à choisir et les saturations à leur faire subir pour obtenir chacune des agglutinines nécessaires, à l'exception de l'agglutinine *o*.

Les doubles saturations par lesquelles on obtient les aggluti-

TABLEAU I.

IMMUNISÉRUMS	SATURÉS AVEC	AGGLUTININES restantes
<i>Derby</i> ( <i>f</i> , <i>g</i> ) . . . . .	<i>Essen</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> ) + <i>budapest</i> ( <i>g</i> , <i>t</i> ).	<i>f</i>
<i>Oranienburg</i> ( <i>m</i> , <i>t</i> ) . . . . .	<i>Senftenberg</i> ( <i>g</i> , <i>s</i> , <i>t</i> ) + <i>berta</i> ( <i>f</i> , <i>g</i> , <i>t</i> ).	<i>m</i>
<i>Dublin</i> ( <i>g</i> , <i>p</i> ) . . . . .	<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ).	<i>p</i>
<i>Blegdam</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> ) . . . . .	<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ).	<i>q</i>
<i>Oranienburg</i> ( <i>m</i> , <i>t</i> ) . . . . .	<i>Montevideo</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>s</i> ).	<i>t</i>
<i>Rostock</i> ( <i>g</i> , <i>p</i> , <i>u</i> ) . . . . .	<i>Dublin</i> ( <i>g</i> , <i>p</i> ).	<i>u</i>
<i>Blegdam</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> ) . . . . .	<i>Moscow</i> ( <i>g</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>3</sup> ) + <i>oranienburg</i> ( <i>m</i> , <i>t</i> ).	<i>z</i> <sup>1</sup>
<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ) . . . . .	<i>Blegdam</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> ).	<i>z</i> <sup>2</sup>
<i>Moskow</i> ( <i>g</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>3</sup> ) . . . . .	<i>Blegdam</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> ).	<i>z</i> <sup>3</sup>

nines *f* et *m* sont rendues nécessaires, ainsi que l'a montré Kauffmann [8] par la complexité des antigènes *g* et *t*.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas obtenir l'agglutinine *o* pure. On prépare donc 4 sérums saturés selon le tableau II ci-dessous :

TABLEAU II.

IMMUNISÉRUMS	SATURÉS AVEC	AGGLUTININES restantes
<i>Moskow</i> ( <i>g</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>3</sup> ) . . . . .	<i>Dublin</i> ( <i>g</i> , <i>p</i> ).	<i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> .
<i>Moskow</i> ( <i>g</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>3</sup> ) . . . . .	<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ).	<i>q</i> , <i>z</i> <sup>2</sup> .
<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ) . . . . .	<i>Dublin</i> ( <i>g</i> , <i>p</i> ).	<i>o</i> , <i>m</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> .
<i>Enteritidis</i> ( <i>g</i> , <i>m</i> , <i>o</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> ) . . . . .	<i>Moskow</i> ( <i>g</i> , <i>o</i> , <i>q</i> , <i>z</i> <sup>3</sup> ).	<i>m</i> , <i>z</i> <sup>1</sup> , <i>z</i> <sup>2</sup> .

Une souche dont les suspensions H sont agglutinées par le premier de ces sérums et non agglutinées par le second, ou sont agglutinées par le troisième et non par le quatrième, possède l'antigène *o*.

Ces différents sérums saturés ont des titres en général assez bas et sont impropres à l'agglutination sur lame. On doit les faire agir sur des cultures en bouillon formolées (lecture après trois et quatre heures au thermostat à eau à 52° C).

Au point de vue biochimique, ainsi que l'a montré Kauffmann [9], les caractères les plus importants de *S. blegdam* sont la lenteur avec laquelle elle acidifie l'eau peptonée additionnée de dulcité (1 p. 100 de dulcité avec bleu de bromothymol comme indicateur) et la lenteur avec laquelle elle fait virer le bouillon de Stern au glycérol. Alors qu'avec *S. enteritidis* (var. *lëna*), l'un et l'autre milieu sont modifiés en moins de vingt-quatre heures, avec *S. blegdam*, le premier ne montre qu'après trois

jours un léger virage avec une fine bulle de gaz ; avec le milieu de Stern, le virage au rouge n'est évident que plus tardivement encore.

Pour ces raisons, au point de vue biochimique, *S. blegdam* ne peut être confondue qu'avec *S. moscow* (1), salmonelle fort répandue chez l'homme en Europe orientale. Mais, si l'une et l'autre contiennent l'antigène *q*, la première contient en outre les antigènes *m* et *z*<sup>1</sup> qui manquent chez la seconde, et cette dernière contient l'antigène *z*<sup>3</sup> qui manque chez la première.

★ ★

La première souche de *S. blegdam* a été isolée en 1935 du sang d'un malade de l'hôpital Blegdam, à Copenhague, malade qui était atteint de pneumonie. Elle a été étudiée par Kauffmann [40], qui en a fait un type nouveau, dont il a précisé la constitution antigénique et le comportement biochimique.

La seconde souche de ce type qui ait été signalée s'est rencontrée dans une de nos hémocultures, à Changhaï, en 1938. Ne disposant pas, à cette époque, du matériel ni des techniques nécessaires à l'identification des salmonelles, nous envoyâmes cette souche au professeur Kauffmann, qui l'identifia et qui nous adressa une collection de souches et de sérums ainsi que de précieuses indications grâce auxquelles nous avons pu poursuivre cette étude.

De 1938 à 1948 inclus, nous avons isolé à Changhaï quatorze souches de *S. blegdam* chez 10 malades différents, quatre souches du même type chez 4 rats capturés par les services d'hygiène de la ville et quatre autres souches chez différents petits rongeurs d'élevage décimés par une épizootie.

En 1946, Stevens [43] en signale deux souches isolées chez l'homme aux Philippines.

En 1947, Jones et Fenner [5] relatent 14 cas d'infection à *S. blegdam* observés chez des indigènes de Nouvelle-Guinée.

En 1948, Jude et Le Minor [6], étudiant un stock de souches de provenance humaine isolées en Indochine, identifient parmi elles deux *S. blegdam*.

D'autre part, en lisant le travail de P. Y. Liu [41], on constate qu'il se trouve dans le matériel réuni par lui à Pékin deux souches du groupe D dont le complexe II contient les antigènes *g*, *m*, *o*, *q*, *z*<sup>1</sup> et qui ne diffèrent de *S. blegdam* que par la présence

(1) La variante *Chaco* de *S. enteritidis*, dont l'action sur le glycérol en milieu de Stern et sur la dulcité est identique à celle de *S. blegdam* et de *S. moscow*, est trop exceptionnellement rencontrée pour entrer en ligne de compte.



additionnelle des antigènes « accessoires »  $z^2$  et  $z^3$ . Ces souches attaquent la dulcité lentement, comme le fait *S. blegdam*.

En définitive, il semble bien que cette salmonelle soit loin d'être exceptionnelle en Extrême-Orient. Dans notre pratique personnelle à Changhaï, elle est plus fréquemment rencontrée que le B. de Gärtner (= *S. enteritidis*) lui-même, dont nous avons isolé dix souches seulement (six de malades et quatre de rats ; deux de la variante *Iéna* et huit de la variante *Ratin*) dans le même temps que nous en isolions vingt-deux de *S. blegdam* (2). A Changhaï, d'après une expérience portant sur onze années, *S. blegdam* comprend 20 p. 100 des salmonelles autres que le B. d'Eberth isolées chez l'homme et 20 p. 100 des salmonelles isolées chez les rats. Signalons que, jusqu'à présent, *S. blegdam* n'a été rencontrée, en dehors de l'homme, que chez les petits rongeurs : huit souches isolées à Changhaï par Raynal et nous [12] chez des rats sauvages, chez un rat et chez des souris d'élevage, et chez des cobayes spontanément infectés.



Les circonstances cliniques à l'occasion desquelles nous avons isolé nos quatorze souches d'origine humaine sont les suivantes :

*Cas n° 1.* — Chinois, vingt-quatre ans, présentant une fièvre en plateau avec des signes méningés nets, mais sans modification du liquide céphalo-rachidien. L'hémoculture, pratiquée au septième jour de la maladie, donne *S. blegdam*. La réaction de Widal, qui était négative lors de l'entrée à l'hôpital, devient nettement positive par la suite avec la suspension Eberth-O. Traitement : abcès de fixation. Guérison.

*Cas n° 2.* — Garçon chinois de quinze ans présentant une fièvre à grandes oscillations précédée et accompagnée par une diarrhée sanguinolente. On note en outre une bronchite intense ainsi que des signes parésiques et paresthésiques aux membres inférieurs qui font craindre le bérubéri. *S. blegdam* est isolée du sang et des selles. Le Widal est positif au-dessus de 1/3.200 avec Eberth-O et avec la salmonelle isolée du sang. Traitement : vitamines B, entérovioforme. Guérison.

*Cas n° 3.* — Femme chinoise, vingt ans, présentant un syndrome septicémique grave à la suite d'un curetage utérin *post abortum*. L'hémoculture donne *S. blegdam*. Décès le lendemain de l'admission à l'hôpital.

*Cas n° 4.* — Garçon chinois de dix-sept ans, entré à l'hôpital

(2) Il est intéressant de rapprocher cette constatation de celles des auteurs soviétiques qui montrent qu'en U.R.S.S. *S. moscow*, salmonelle possédant elle aussi l'antigène *q*, est plus fréquemment rencontrée chez l'homme que *S. enteritidis*.

avec des signes de méningite consécutifs à une pyrexie indéterminée qui avait duré trois semaines environ. Les urines sont troubles et contiennent des cylindres granuleux. *S. blegdam* est isolée dans le liquide céphalo-rachidien purulent et dans les urines. Elle est agglutinée à 1/1.600 par le sérum du malade. Sulfamidothérapie. Guérison.

*Cas n° 5.* — Chinois, quarante ans, convalescent de typhus exanthématique (signes cliniques nets ; Weil-Félix fortement positif à plusieurs reprises). La fièvre, qui était tombée, se rallume brusquement. *S. blegdam* est isolée du sang à deux reprises. L'état général devient rapidement critique. Traitement : urotropine intraveineuse. Décès.

*Cas n° 6.* — Métis sino-européen, trente-sept ans, atteint de gangrène symétrique des orteils à la suite d'une atteinte de typhus exanthématique (Weil-Félix fortement positif). Fièvre accompagnée de diarrhée liquide. *S. blegdam* est isolée du sang et des selles. Traitement : urotropine intraveineuse et entérovioforme. Décès.

*Cas n° 7.* — Fillette chinoise de trois ans hospitalisée pour une fièvre irrégulière longtemps prolongée. On découvre chez cette enfant un abcès fessier profond, dans le pus duquel nous isolons *S. blegdam*. Widal fortement positif avec *Eberth-O* et avec *S. blegdam* (*O* et *H*). Incision de l'abcès. Guérison.

*Cas n° 8.* — Européen de cinquante ans, atteint de sprue. *S. blegdam* est le seul germe pathogène qui ait été isolé des selles (en une seule occasion) au cours d'une longue évolution. Opothérapie hépatique intense. Guérison.

*Cas n° 9.* — Nourrisson chinois atteint de méningite aiguë. On note aussi l'existence de deux abcès fessiers profonds. *S. blegdam* est isolée du liquide céphalo-rachidien purulent. Traitement : pénicilline et sulfadiazine. Décès.

*Cas n° 10.* — Nourrisson chinois atteint de méningite aiguë. Le liquide céphalo-rachidien purulent contient des cocci Gram-positifs ayant la morphologie du pneumocoque. La culture donne *S. blegdam*. Traitement : pénicilline et sulfadiazine. Décès.

D'après ces exemples, *S. blegdam* apparaît comme une des salmonelles les plus aptes à provoquer des infections du type septicémique, comme c'est le cas chez 9 de nos 10 malades. Toutes les publications relatives à *S. blegdam* concourent à établir cette notion. Le cas princeps de Kauffmann relève de ce type. Il en va de même pour 13 des 14 cas relatés par Jones et Fenner [5] en Nouvelle-Guinée et pour au moins 1 des 2 cas de Stevens [13] aux Philippines. Jude et Le Minor [6] mentionnent que leurs souches ont été isolées en Indochine au cours d'infections typho-paratyphoïdiques.

La gravité de l'infection à *S. blegdam* paraît considérable : cinq décès dans notre série de 10 cas ; quatre décès dans la série de 14 cas de Jones et Fenner. Ces derniers auteurs, tout en soulignant cette gravité, considèrent comme possible que de nombreux cas bénins passent inaperçus. Cependant, dans notre pratique personnelle à Changhaï, plus de 7.000 coprocultures ne nous ont donné *S. blegdam* que trois fois ; encore, dans 2 cas, s'agissait-il de malades à hémocultures positives.

Les localisations suppurées, qui sont une complication classique des salmonelloses septicémiques, paraissent particulièrement fréquentes avec *S. blegdam*. Notre série comprend 3 méningites suppurées, 1 suppuration de l'arbre urinaire et un abcès musculaire profond, avec cultures positives des liquides céphalo-rachidiens, des urines et du pus. On note, en outre, une bronchite et un abcès musculaire profond pour lesquels la culture du pus n'a pas été faite. Le cas princeps de Kauffmann est compliqué de bronchite. Jones et Fenner signalent la fréquence des suppurations de l'arbre génito-urinaire. Une des deux souches de Stevens provient d'une suppuration de la jambe.

Ces complications suppurées apparaissent avec prédilection chez les sujets jeunes : 2 de nos cas de méningite concernent des nourrissons ; un autre cas de méningite, avec suppuration urinaire, concerne un jeune homme de dix-sept ans.

La fréquence relative des complications suppurées des salmonelloses chez les sujets jeunes a déjà été signalée à plusieurs reprises en médecine humaine et en médecine vétérinaire. *S. blegdam* ne fait pas exception à la règle.

Comme les autres salmonelloses septicémiques, l'infection à *S. blegdam* apparaît assez souvent à titre de complication d'une autre maladie infectieuse aiguë. Cette complication s'avère redoutable. Dans 2 cas [2] de notre série, elle s'est manifestée à la suite d'une atteinte de typhus exanthématique. Dans un autre cas, le liquide céphalo-rachidien purulent contenait des pneumocoques en même temps que la salmonelle. Ces 3 cas ont été mortels.

Le B. de Gärtner (*S. enteritidis-Iéna*), dont *S. blegdam* est un germe très voisin, sinon une simple variante, est souvent à l'origine de telles infections secondaires. Pour nous en tenir à l'Extrême-Orient, nous ne citerons que les épidémies de septicémies à *S. enteritidis* survenues à l'occasion d'épidémies de fièvre récurrente à poux, étudiées par Huang, Chang et Lieu [4] en Chine du Nord (3), ainsi que l'épidémie de septicémies à *S. enteritidis* observée au Japon par Hayasaka [3] parmi les

(3) Cette coïncidence a conduit Liu, Zia et Chung à envisager la transmission de *S. enteritidis* par le pou et à réaliser des expériences dont les résultats sont favorables à cette hypothèse.

pensionnaires d'un asile d'aliénés traités par l'impaludation. Plus de 50 p. 100 des cas relatés se terminent par la mort.

★ ★

Nous avons, d'autre part, isolé *S. blegdam* chez des petits rongeurs dans les circonstances suivantes :

1° De 1941 à 1948 inclus, en collaboration avec Raynal [12], nous avons procédé à la recherche des salmonelles dans le sang, la moelle osseuse, les urines et le contenu intestinal de rats capturés par le Service d'Hygiène. Trois mille deux cent soixante-huit rats (dont 97 p. 100 appartenaient à l'espèce *Epimys rattus*) ont été examinés. Nous avons trouvé des salmonelles chez 20 d'entre eux. Quatre de ces derniers hébergeaient *S. blegdam* (sang, moelle osseuse, urines).

2° Pendant l'automne de 1941, notre élevage de souris albinos fut décimé par une épizootie à l'occasion de laquelle nous isolâmes *S. blegdam* dans le sang d'une des souris blanches malades. Cependant, sur 5 souris éprouvées, une seule possédait dans son sérum des agglutinines anti-*S. blegdam*. La vaccination spécifique fut suivie par l'arrêt de l'épizootie. La maladie était caractérisée par un exanthème intense avec chute des poils particulièrement marquée au niveau du museau.

A la même époque, une épizootie sévissait parmi les cobayes d'un autre laboratoire de Changhaï, dont le directeur nous envoya deux souches qu'il avait isolées du sang de 2 cobayes spontanément infectés : l'une et l'autre appartenaient au type *S. blegdam*.

Au mois de juillet suivant, nous isolâmes encore une souche de *S. blegdam* dans le sang d'un rat albinos de notre élevage, qui avait été inoculé avec des rickettsies murines et dont la mort nous paraissait suspecte.

Chez les petits rongeurs, comme chez l'homme, l'infection à *S. blegdam* paraît donc être essentiellement du type septicémique et susceptible d'apparaître comme infection secondaire.

A cette occasion, nous avons étudié comparativement le pouvoir pathogène expérimental de *S. blegdam*, de *S. enteritidis* (*Iéna* et *Ratin*) et de 4 autres types voisins (*S. berta*, *S. dublin*, *S. rostock* et *S. moskow*) qui sont souvent considérés comme des variantes du B. de Gärtner. Nous n'avons constaté aucune différence entre eux. Leurs suspensions chauffées sont également toxiques. Avec les unes et les autres, selon les doses et selon les voies d'inoculation, on obtient, soit une septicémie rapidement mortelle, soit une affection prolongée avec formation d'abcès viscéraux multiples dans le pus desquels on isole le germe. On n'observe pas de diarrhée.



## RÉSUMÉ.

Nous indiquons une technique pour l'identification de *S. blegdam* (IX. XII : g, m, o, q, z<sup>1</sup>), salmonelle du groupe D très voisine du B. de Gärtner, sinon une simple variante de ce dernier.

*S. blegdam* paraît assez répandue en Extrême-Orient, A Changhaï, on la rencontre plus souvent que le B. de Gärtner lui-même.

Chez l'homme, elle se comporte comme un agent d'affections septicémiques graves, parfois secondaires à une autre infection aiguë, volontiers compliquées de localisations suppurées, surtout chez les sujets jeunes.

Nous avons, d'autre part, isolé *S. blegdam* chez des rats capturés dans différents quartiers de Changhaï et chez des petits rongeurs d'élevage éprouvés par une épizootie. Chez tous ces animaux, il s'agit d'infections du type septicémique. Dans 1 cas, l'infection à salmonelle a succédé à l'inoculation de rickettsies.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] FOURNIER (J.). Serological Typing of *S. enteritidis* isolated in Changhaï. *Chinese Med. J.*, 1942, **61**, 148.
- [2] FOURNIER (J.) et LOU (W.). Deux cas de typhus exanthématique compliqués de septicémie à *S. enteritidis*. *Bull. Med. Univ. L'Aurore* (Changhaï), 1942, **7**, 102.
- [3] HAYASAKA (C.). Im Verlauf einer Malariakur durch *B. enteritidis*-Gaertner entstandene Meningitis und Sepsis. *Tôhoku J. exp. Med.*, 1933, **21**, 466-504.
- [4] HUANG (C. H.), CHANG (H. C.) et LIEU (V. T.). Salmonella Infection. *Chinese Med. J.*, 1937, **52**, 345-366.
- [5] JONES (H. I.) et FENNER (F.). Infection with *S. blegdam* amongst Natives of New-Guinea. *Med. J. Australia*, 1947, **2**, 356.
- [6] JUDE (A.) et LE MINOR (L.). Salmonella isolées en Indochine au cours d'affections typho-paratyphoïdiques. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1948, **41**, 129.
- [7] KAUFFMANN (F.). On the Serology of the Salmonella Group. *Acta Path. et Micr. Scand.*, 1947, **24**, 242.
- [8] KAUFFMANN (F.). Salmonella Probleme. *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1937, **120**, 117-197.
- [9] KAUFFMANN (K.). Ueber die Typeneinteilung der Gärtner Gruppe. *Ibid.*, 1935, **117**, 431-450.
- [10] KAUFFMANN (F.). *Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe*; Einar Munksgaard, Copenhagen, 1941.
- [11] LIU (P. Y.). Serological Typing of *S. enteritidis* isolated in Peiping. *Chinese Med. J.*, Suppl. **2**, 1938, 279.
- [12] RAYNAL (J.) et FOURNIER (J.). *Les Salmonelles à Changhaï*. Monographies de l'Institut Pasteur de Changhaï, Changhaï, 1945.
- [13] STEVENS (R.). The Occurrence of *S. blegdam* in the Philippines. *J. Bact.*, 1946, **52**, 146.

# LE CATABOLISME OXYDATIF DES ACIDES AMINÉS CHEZ LES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

par B. NISMAN et G. VINET.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

En plus du mécanisme de désamination couplée entre paires d'acides aminés mis en évidence pour la première fois par Stickland [1] chez *Cl. sporogenes* et de la désamination des acides aminés individuels qu'on rencontre le plus souvent chez les espèces anaérobies démunies d'enzymes donnant la réaction de Stickland (*Cl. saccharobutyricum* [2]), il a été montré récemment que les anaérobies stricts possèdent des systèmes enzymatiques capables d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'hydrogène [3, 4]. On peut caractériser les acides  $\alpha$ -cétoniques comme produits intermédiaires de l'attaque oxydative des substrats suivants : valine, leucine, norleucine, phénylalanine, isoleucine et méthionine. La consommation d'oxygène pour certains de ces substrats étant de 2 atomes par molécule d'acide aminé dégradé, nous avons pensé que cela pouvait s'expliquer par une formation d' $H_2O_2$  suivant la réaction connue concernant la *l*- et la *d*-aminoacide-oxydase [5, 6]. L'objet de ce travail est : 1° l'extension de l'étude du mécanisme oxydatif de désamination à d'autres acides aminés ; 2° l'étude des produits, formés à l'air, à partir d'acides aminés ; 3° l'apport d'autres précisions sur la formation ou non de l'eau oxygénée ; 4° une étude comparative entre le métabolisme des acides aminés à l'air ou en absence d'air. Dans le prochain Mémoire nous nous occuperons de l'activité enzymatique des extraits de ces mêmes organismes.

## MÉTHODES ET TECHNIQUES.

**PRÉPARATIONS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.** — Des cultures de *Cl. sporogenes* GO1 et *Cl. saccharobutyricum* GR4, sur bouillon de cœur ou VF non glucosé âgées de quatorze à seize heures, sont centrifugées. Le culot bactérien est lavé une fois à l'eau physiologique stérile et froide. On recentrifuge les bactéries et on amène les corps bactériens à la dilution désirée dans de l'eau physiologique. La densité des suspensions est exprimée en milligrammes d'N bactérien par millilitre de suspension.

**Acides aminés.** — Les acides aminés utilisés sont des produits

Hoffmann-La Roche. Les acides aminés racémiques ont été employés à une concentration double par rapport à la concentration des isomères naturels.

*Les mesures d'oxygène consommé* ont été effectuées dans l'appareil de Warburg. Après la réaction, le contenu de la cupule est déprotéinisé avec de l'acide métaphosphorique 2N (ou  $\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$  conc. finale 4 p. 100), des échantillons sont prélevés pour le dosage d' $\text{NH}_3$  et des acides  $\alpha$ -cétoniques.  $\text{NH}_3$  a été dosé par la méthode de Raynaud [7] avec des réactifs à N/100.

Les acides  $\alpha$ -cétoniques ont été dosés par la méthode de Clift et Cook [8], selon la micro-adaptation de Blanchard, Green, Nocito et Ratner [6]. Les *acides volatils* ont été déterminés par la méthode de distillation de Duclaux. A cet effet, on procède comme suit : une solution d'acide aminé dans un tampon M/15 pH 7.1 est agitée à l'air dans des fioles coniques à 37°, avec une suspension bactérienne correspondant à 30 mg. d'N bactérien, pendant cent vingt minutes, vol. total : 20 ml. Des portions aliquotes sont prélevées pour effectuer des dosages d' $\text{NH}_3$  et d'acides  $\alpha$ -cétoniques. Le volume restant est entraîné à la vapeur d'eau après acidification par 10 ml. d'acide tartrique N. Le produit de l'entraînement, soit 130 ml., est recueilli, dont 20 ml. servent à la détermination de l'acidité volatile totale et, sur le restant, on effectue le Duclaux.

La catalase utilisée a été préparée selon Keilin et Hartree [9].

La nomenclature des organismes anaérobies adoptée est celle de A.-R. Prévot [10].

## RÉSULTATS.

### A. — *Cl. sporogenes*.

1° ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES SUSPENSIONS. — Les suspensions ayant la plus forte activité sont celles provenant de cultures âgées de quatorze à seize heures.

*Perte de l'activité enzymatique.* — Le séjour à la glacière entraîne des pertes d'activité considérables. Les suspensions de *Cl. sporogenes* ayant séjourné six heures à 6° n'attaquent plus que l'alanine, tandis que la respiration des témoins reste assez importante. Les consommations d'oxygène diminuent avec le temps. L'activité des suspensions dépend, dans une large mesure, de la dilution.

*Respiration des témoins.* — Les suspensions consomment relativement beaucoup d'oxygène. Les suspensions provenant des cultures âgées de plus de vingt heures respirent davantage mais n'attaquent pas les substrats. En présence de substrat, la consommation d' $\text{O}_2$  est d'autant plus grande et se prolonge d'autant plus de temps que les suspensions sont plus denses. La figure 1 repré-

sente la respiration en fonction de la densité bactérienne. Avec des suspensions très diluées, la consommation d'O<sub>2</sub> est négligeable. On a avantage à travailler avec des suspensions dont le taux d'N se trouve entre 5-6 mg. par millilitre de suspension.

2° ACIDES AMINÉS DÉAMINÉS A L'AIR AVEC CONSOMMATION D'OXYGÈNE. — Cet organisme désamine les substrats suivants : alanine,

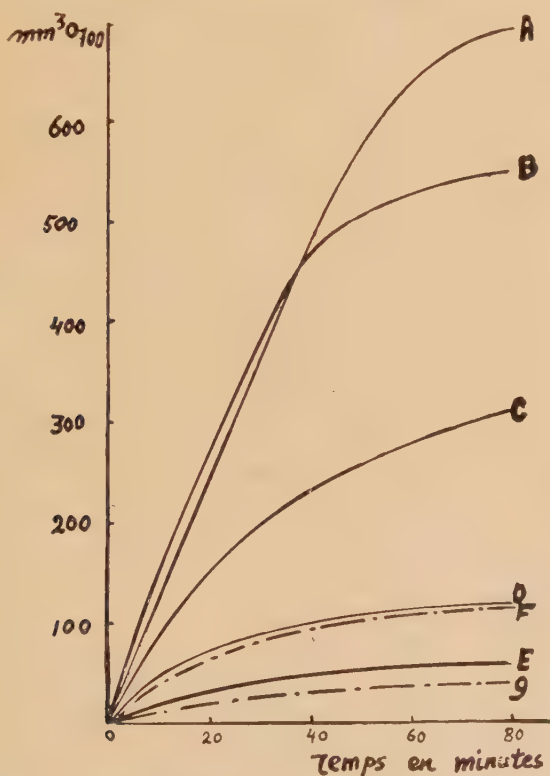


FIG. 1. — Consommation d'O<sub>2</sub> par les suspensions de *Cl. sporogenes* en présence de 30 µ mols de (l)leucine comme substrat, et en fonction de la densité bactérienne (1 ml. = 5,60 mg. N); A, 30 µ mols leucine + 1 ml. suspension; B, 30 µ mols leucine + 0,8 ml. suspension; C, 30 µ mols leucine + 0,6 ml. suspension; D, 30 µ mols leucine + 0,4 ml. suspension; E, 30 µ mols leucine + 0,3 ml. suspension; F, témoin 1 ml. suspension; G, témoin 0,3 ml. suspension.

leucine, norleucine, isoleucine, phénylalanine, méthionine, valine, cystéine, thréonine et sérine.

Les acides aminés attaqués sont tous des isomères naturels.

Acide aminé attaqué sans consommation d'oxygène : arginine.



Acides aminés non attaqués : glycine, proline, histidine, glutamate et ornithine.

$O_2$  absorbé/ $NH_3$  dégagé. — Pour les acides aminés suivants : alanine, valine, leucine, norleucine, isoleucine et cystéine (1).

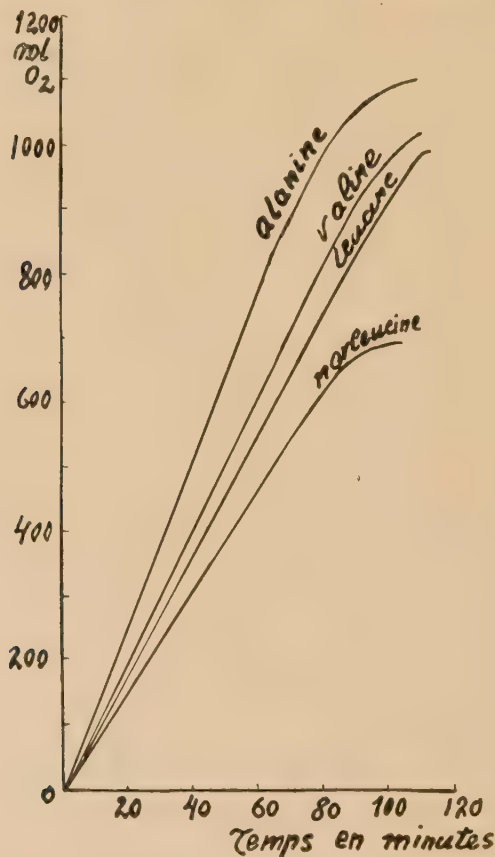


FIG. 2. — *Cl. sporogenes*. Vitesse de dégradation des substrats (50  $\mu$  mols substrat + 1 ml. suspension).

$O_2/NH_3 = 1$ . Pour les acides aminés tels que : méthionine, thréonine et sérine,  $O_2/NH_3 = 0,5$ . Pour la phénylalanine,  $O_2/NH_3 < 0,5$ .

(1) Le cas de la cystéine sera discuté dans un autre Mémoire. On sait que cet amino-acide est oxydé en présence d' $O_2$  non enzymatiquement. Les rapports  $O_2/NH_3$  donnés ici concernant ce substrat semblent donc être inexacts à cause du manque de témoin de l'oxydation de la cystéine seule.

TABLEAU I. —  $O_2/NH_3$  (*Cl. sporogenes*).

30  $\mu$  mols d'acide aminé dans du tampon phosphate M/15, pH 7,1 + 1 ml. de suspension bactérienne ( $N = 5,6$ ). Volume total, 3,0 ml. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH 10 p. 100. Durée de l'expé-

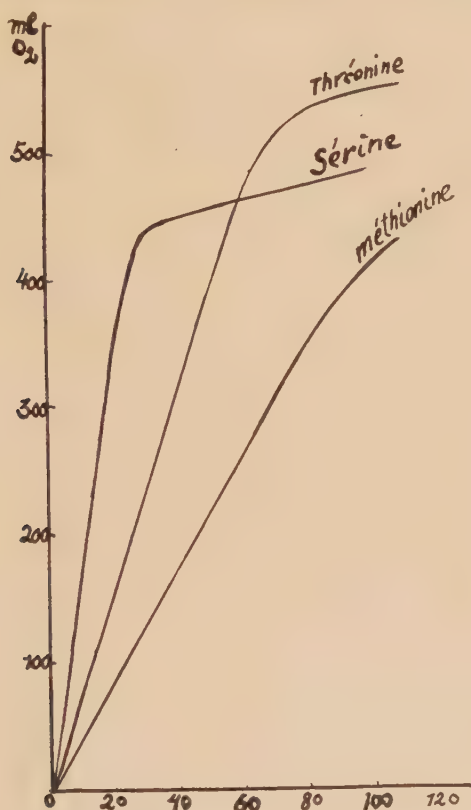


FIG. 3. — *Cl. sporogenes*. Vitesse de dégradation de la thréonine, de la sérine et de la méthionine (50  $\mu$  mols de substrat + 1 ml. de suspension bactérienne).

rience, soixante-dix minutes.  $NH_3$  et  $O_2$  exprimés en  $\mu$  mols. Phase gazeuse : air. Température : 37°.

SUBSTRAT	$O_2$	$NH_3$	$O_2/NH_3$
Alanine . . . . .	28,7	30,0	0,95
Leucine . . . . .	30,0	30,0	1,0
Norleucine . . . . .	21,6	22,0	0,98
Isoleucine . . . . .	15,0	17,0	0,88
Valine . . . . .	23,0	26,0	0,88
Phénylalanine . . . . .	5,4	16,0	0,33
Méthionine . . . . .	16,0	32,0	0,50
Cystéine . . . . .	22,0	22,6	0,97
Sérine . . . . .	13,0	30,0	0,43
Thréonine . . . . .	22,0	36,0	0,61

$Q_{O_2}^N$  figures 2 et 3. Les figures 2 et 3 ainsi que le tableau II représentent les vitesses de dégradation des substrats. Les acides aminés sont oxydés suivant cet ordre de vitesse décroissante : alanine, valine, leucine, norleucine, méthionine, cystéine, thréonine, sérine et isoleucine. Le tableau suivant donne la grandeur des  $Q_{O_2}^N$  avec ces substrats.

TABLEAU II. —  $Q_{O_2}^N$  des suspensions de *Cl. sporogenes*  
pour les différents acides aminés.

50 micromols. d'acide aminé + 1 ml. de suspension (7 mg N) dans du tampon phosphate, pH 7,1 M/15. Dans la partie centrale 0,2 ml. de KOH : 10 p. 100. Volume total 3,0 ml. Phase gazeuse : air. Durée de l'expérience : cent dix minutes. Température : 37°. Résultats exprimés en ml.  $O_2$ /mg. N.

Alanine . . . . .	86
Valine. . . . .	74
Leucine. . . . .	71
Norleucine . . . . .	61
Méthionine . . . . .	32
Cystéine. . . . .	64
Thréonine . . . . .	60
Sérine. . . . .	52
Isoleucine. . . . .	35

La respiration du témoin a été défalquée.

*Produits de la réaction.* — Nous avons caractérisé précédemment [3, 4] les acides  $\alpha$ -cétoniques correspondant aux acides aminés suivants : phénylalanine, leucine, isoleucine, valine et méthionine. Nous avons pu dans les mêmes conditions montrer que la norleucine donne naissance à l'acide  $\alpha$ -cétonique correspondant que nous avons pu isoler sous forme de 2-4.dinitrophénylhydrazone (voir tableau II bis).

TABLEAU II bis. — Dégradation de la dl-norleucine  
par les suspensions de *Cl. sporogenes*.

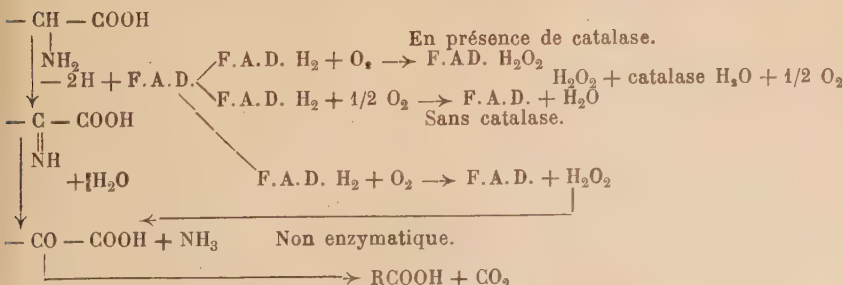
La dl-norleucine dans du tampon phosphate M/15, pH 7,1 est agitée pendant cent vingt minutes avec une suspension de *Cl. sporogenes* (18,4 mg N) à 37° C. Le milieu réactionnel est déprotéinisé par  $Cl_2C-COOH$  (conc. finale 4 p. 100). Des échantillons sont prélevés pour le dosage de l'acide  $\alpha$ -cétonique et de  $NH_3$ . Le volume restant sert à la caractérisation de l'acide  $\alpha$ -cétonique sous forme de 2-4.dinitrophénylhydrazone. A cet effet, on ajoute la quantité aliquote de 2-4.dinitrophénylhydrazine à 0,8 p. 100 dans HCl 2N. L'hydrazone précipite instantanément. On lave le produit avec de l'eau acidifiée à l'HCl. Le produit est séché dans le vide sur KOH et  $P_2O_5$ .

Pf (6) de la 2-4.dinitrophénylhydrazone de l'acide $\alpha$ -cétonique de la norleucine corrig. décomp. 134°-135°-136°		Pf DU PRODUIT RECUEILLI 135°		
Micromols de substrat	Micromols NH <sub>3</sub> de désamination théorique	Micromols NH <sub>3</sub> dégagés	Micromols RCO COOH formés	RCO COOH NH <sub>3</sub>
500	250	200	16 (4)	0,08
(1) La plus grande partie de l'acide $\alpha$ -cétonique a probablement été dégradée en acide volatil.				

L'alanine, la sérine, la cystéine et la thréonine donnent par désamination oxydative les acides  $\alpha$ -cétoniques correspondants qu'on peut caractériser par la coloration rouge que prend le milieu réactionnel additionné de quelques gouttes de réactif à la 2-4 dinitrophénylhydrazine, lorsqu'on ajoute une petite quantité d'alcali. Les quantités d'acides  $\alpha$ -cétoniques étant minimales, l'isolement n'a pas été poursuivi.

**Rapport acide  $\alpha$ -cétonique/NH<sub>3</sub>.** — Le tableau suivant montre que la plus grande partie des acides  $\alpha$ -cétoniques provenant de la désamination des substrats n'est pas retrouvée. Cette disparition des acides  $\alpha$ -cétoniques peut être interprétée de différentes façons :

1° On sait depuis Holleman [41] que les acides  $\alpha$ -cétoniques peuvent être dégradés par l'eau oxygénée, ainsi le pyruvate donne en présence d'eau oxygénée de l'acide acétique et du CO<sub>2</sub>. Ce mécanisme est essentiellement non-enzymatique et peut se produire dans le cas des amino-acide-oxydases (*l* ou *d*) des mammifères qui forment de l'eau oxygénée lors de la réoxydation du groupement prosthétique (F.A.D. = flavine-adenine-dinucléotide) par l'oxygène moléculaire. Tel est le cas de la *l*- et *d*-amino-acide-oxydase qui en absence de catalase consomme deux atomes d'oxygène par molécule d'acide aminé et où les acides  $\alpha$ -cétoniques sont oxydés ultérieurement par l'eau oxygénée suivant ce schéma :





2° D'autres mécanismes de dégradation des acides aminés existent chez les organismes inférieurs aérobies tels que *l*-amino-acide-oxydase de *P. vulgaris* [12] et la *d*-amino-acide-oxydase de *Neurospora crassa* [13]. Ces enzymes ne forment pas de  $H_2O_2$ . Dans le cas des anaérobies étudiés (*Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*), la mise en évidence par la catalase de l'eau oxygénée comme produit de la réaction des amino-acide-oxydases a été négative. En effet, en présence d'un grand excès de catalase, il n'y a pas d'inhibition de la quantité d'oxygène absorbé pour aucun des acides aminés étudiés dont le rapport  $O_2/NH_3 = 1$ , tel qu'il ressort des données du tableau précédent. D'autre part,

TABLEAU III. —  $RCOCOOH/NH_3$  en présence et en absence de catalase.

50 micromols. d'acide aminé dans du tampon phosphate pH 7,1 M/15 + 1 ml. de suspension bactérienne ( $N = 6,1$  mg.). Volume total, 3,0 ml. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH : 10 p. 100. Phase gazeuse : air. Durée de l'expérience : cent vingt minutes. Température : 37°. Résultats exprimés en micromols.

	SANS CATALASE			$\frac{RCOCOOH}{NH_3}$	AVEC CATALASE			$\frac{RCOCOOH}{NH_3}$
	$O_2$	$NH_3$	$RCOCOOH$		$O_2$	$NH_3$	$RCOCOOH$	
Alanine . . . . .	44,6	49	1,2	0,02	46,1	51	1,6	0,03
Leucine . . . . .	40,2	48	4,9	0,11	42	49	5,5	0,11
Valine . . . . .	44,4	52,2	3,8	0,07	46,8	51,7	2,8	0,05
Isoleucine . . . . .	24,6	21,5	3,2	0,14	23,8	25	3,9	0,16
Méthionine . . . . .	19	40						
Phénylalanine (1) . .	5,4	22,7	3,7	0,16				
Thréonine . . . . .	24,4	39,9	6	0,15				

(1) Ce substrat est très fortement désaminé sans consommer beaucoup d' $O_2$ .  $O_2/NH_3 = 0,24$ .

Keilin et Hartree [9] ont montré que lorsqu'on ajoute de la catalase et de l'éthanol à tout système enzymatique qui produit de l'eau oxygénée, la catalase dans ces conditions agit peroxydativement sur l'éthanol pour former de l'acétaldéhyde. C'est ce qu'on appelle l'oxydation couplée. En d'autres termes, il y a le double d' $O_2$  consommé. Afin de mettre en évidence l'eau oxygénée par cette réaction, nous avons réalisé les expériences suivantes :

TABLEAU IV.

1. — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne (N = 5,50).
2. — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne + 20  $\mu$  mols. d'acide aminé.
3. — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne + 20  $\mu$  mols. d'acide aminé + 0,2 ml. de catalase.
4. — 20  $\mu$  mols. acide aminé + 0,2 ml. catalase.
5. — 20  $\mu$  mols. éthanol + 0,2 ml. catalase + 1 ml. de suspension bactérienne.
6. — 20  $\mu$  mols. acide aminé + 1 ml. de suspension bactérienne.

On complète le volume par du tampon phosphate à 3,0 ml. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH. Durée de l'expérience : quatre-vingt-dix minutes. Température : 37°. O<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub> sont exprimés en  $\mu$  mols.

	O <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>
1 . . . . .	7,1	»
2 . . . . .	26,3	22,2
3 . . . . .	29	23,6
4 . . . . .	21,8	23
5 . . . . .	10,2	»
6 . . . . .	19	20,1

Acide aminé = leucine.

La respiration des témoins a été déduite.

On voit que la catalase en excès ne diminue pas la valeur du rapport O<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub>. Le système 1 ainsi que les systèmes 3 et 2 consomment beaucoup d'oxygène. Si on peut expliquer l'augmentation de 3 par l'oxydation couplée, on ne voit pas comment on peut interpréter l'oxydation de l'éthanol en présence de catalase (système 5) ainsi que de l'éthanol (1) seul. De plus, si l'oxydation couplée peut être un test sensible pour la démonstration de la présence de l'eau oxygénée comme dans le cas de la *l*- ou de la *d*-amino-acide-oxydase des mammifères, où les enzymes étaient purs, ce test ne peut pas servir dans notre cas, où on se trouve en présence de bactéries entières qui contiennent une multitude d'enzymes. Considérant que la catalase en excès ne diminue pas la quantité d'oxygène consommé et qu'elle n'empêche pas la dégradation des acides  $\alpha$ -cétoniques, on a des raisons de penser avec beaucoup de probabilité, qu'il n'y a pas d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formée pendant la réaction, et que dans ce cas la dégradation des acides  $\alpha$ -cétoniques s'effectue par des enzymes spécifiques et peut expliquer les rapports O<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub>. La figure 4 nous montre la dégradation du pyruvate avec des suspensions bactériennes de *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*, on voit que l'acide  $\alpha$ -cétonique consomme de l'oxygène en présence de suspensions des deux bactéries. Nous allons d'ailleurs revenir ultérieurement sur ce point [14].

*Acides volatils formés en aérobiose.* — Les produits formés en aérobiose aux dépens des acides  $\alpha$ -cétoniques correspondant à la leucine, à la valine et à l'isoleucine et probablement à la norleucine se retrouvent sous forme d'acides volatils. On peut constater que la valine est dégradée en acide isobutyrique, la leucine en acide isovalérianique et l'isoleucine donne un acide volatil supérieur, probablement l'acide isovalérianique optiquement actif,

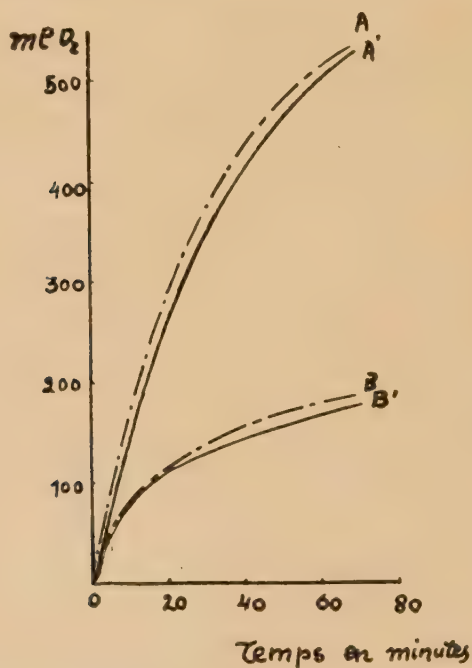


FIG. 4. — Consommation d' $O_2$  avec 50  $\mu$  mols de pyruvate de Na + 1 ml. de suspension bactérienne (5,90 mg. N); A, *Cl. saccharobutyricum*; A', *Cl. sporogenes*; B, témoin *Cl. saccharobutyricum*; B', témoin *Cl. sporogenes*.

faits qui ont été précédemment vus par Cohen-Bazire, Cohen et Prévot [15] en anaérobiose avec des suspensions de bactéries anaérobies. A part les acides volatils qui se forment par décarboxylation des acides  $\alpha$ -cétoniques, on trouve également de petites quantités d'acides  $\alpha$ -cétoniques. Des faits rapportés plus haut, on peut supposer que les acides  $\alpha$ -cétoniques sont dégradés en acides volatils suivant ce mécanisme :

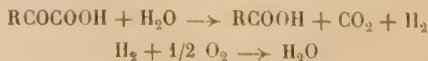


TABLEAU V.

Formation des acides volatils à partir des acides aminés en aérobiose (*Cl. sporogenes*).

Pour les conditions expérimentales, se rapporter aux détails techniques exposés dans la première partie de ce travail. Résultats exprimés en micromols.

SUBSTRAT	NATURE des acides volatils	NH <sub>3</sub> apparu	RCOOH	ACIDITÉ volatil● totale	RAPPORTS
Leucine. . . . .	Isovalérianique butyrique	628	50	754	4/1
Valine. . . . .	Isobutyrique acétique	468	32	468	2/1
Isoleucine (15). .	Isovalérianique opt. actif	437	41	455	

(1) Notons la présence de l'acide acétique ou butyrique, associés, selon le cas, à l'acide volatil supérieur, qui doivent probablement leur origine aux matières de réserve des bactéries.

*Action des inhibiteurs.* — Dans les tableaux VII et VIII on voit que le cyanure de K et l'alcool octylique secondaire inhibent totalement la désamination et la consommation d'oxygène. Le fluorure de Na, le monofluoroacétate de Na, le benzoate de Na, l'arsénite de Na et l'azoture de Na sont sans effet. La pénicilline est également sans action sur l'oxydation des substrats. L'acide monoiodoacétique n'inhibe pas la désamination, tandis que la quantité d'oxygène consommé diminue. En présence de monoiodoacétate M/200, le rapport O<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> qui est de 1 pour l'alanine, la leucine et la valine, sans l'inhibiteur, se rapproche de 0,5 en présence de ce dernier. On sait depuis Zeller et al. [16] que l'acide monoiodoacétique inhibe compétitivement l'oxydation des acides aminés par la *l*-ophi-amino-acide-oxydase. Nous avons vu que la *l*-amino-acide-oxydase de venin de cobra n'est pas inhibée dans nos conditions par l'acide monoiodoacétique à la concentration M/200.

TABLEAU VI.

Action du monoiodoacétate M/200 sur l'oxydation de la leucine par la *l*-amino-acide-oxydase du venin de cobra.

9 mg. de venin de cobra + 20  $\mu$  mols. de *l*-leucine ; tampon phosphate M/15, pH 7,1. Volume total 3,0 ml. Inhibiteur à la concentration finale, M/200. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH. Température : 37°. Phase gazeuse : air. O<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub> exprimés en  $\mu$  mols. Durée de l'expérience : soixante-dix minutes.



	O <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	RCOCOOH	O <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub>	$\frac{RCOCOOH}{NH_3}$
Substrat sans inhibiteur. . . .	15,3	16,8	8,2	0,89	0,49
Substrat + inhibiteur. . . . .	13,5	15,6	10,5	0,81	0,67
Substrat + 0,1 ml. de catalase.	8,4	16,8	18,2	0,5	1,08

En présence de cet inhibiteur, on ne constate aucune diminution de l'oxygène absorbé (voir le tableau VI). Le mécanisme de la réaction avec cet enzyme en présence ou en absence de l'inhibiteur reste :



TABLEAU VII.

Action des inhibiteurs sur l'oxydation des acides aminés par les suspensions de *Cl. sporogenes*.

Résultats exprimés en p. 100 d'inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> et du dégagement de NH<sub>3</sub>. Substrats utilisés : alanine et leucine.

	NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub>
HCN M/300 . . . . .	100	100
Alc. isoocetylique en solution saturée. . . . .	100	100
FNa M/60. . . . .	0	0
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> M/1.000 . . . . .	10	10
FCH <sub>2</sub> COONa M/60 . . . . .	0	0
ICH <sub>2</sub> COONa M/200. . . . .	20	50
Benzoate de Na M/96 . . . . .	0	0
Pénicilline 6.000 U/1 ml . . . . .	0	0
N <sub>3</sub> Na <sup>M</sup> /75. . . . .	0	0

TABLEAU VIII.

Action du ICH<sub>2</sub>COOH M/200 sur la consommation d'O<sub>2</sub> et le dégagement de NH<sub>3</sub> avec les suspensions de *Cl. sporogenes*.

20  $\mu$ . mols de substrat + 1 ml. de suspension dans du tampon phosphate pH 7,1 M/15. L'inhibiteur se trouve à la concentration finale M/200. Volume total 3,0 ml. Dans la partie centrale 0,2 ml. de KOH 10 p. 100. Phase gazeuse : air. Durée de l'expérience : quatre-vingt-dix minutes. Température : 37°. Résultats exprimés en  $\mu$ . mols.

	SANS INHIBITEUR			AVEC INHIBITEUR		
	O <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub>
Alanine . . . . .	18	20,4	0,89	11,1	19,5	0,56
Leucine . . . . .	18,6	21	0,83	11,4	22	0,5
Valine . . . . .	20	22	0,9	6,5	16,9	0,4

Ces faits confirment que le monoiodoacétate a une action inhibitrice sélective sur les enzymes dégradant les acides aminés dans les suspensions de *Cl. sporogenes*. Seuls les enzymes dégradant les acides  $\alpha$ -cétoniques semblent être inactivés tandis que l'inhibiteur n'a aucune action sur les enzymes qui attaquent l'acide aminé. D'autre part, ceci constitue une preuve supplémentaire qu'il n'y a pas de formation d'eau oxygénée au cours de la réaction avec les suspensions de cet anaérobie.

B. — *Cl. saccharobutyricum*.

Les acides aminés suivants sont attaqués avec consommation d'oxygène : alanine, leucine, isoleucine, phénylalanine, méthio-

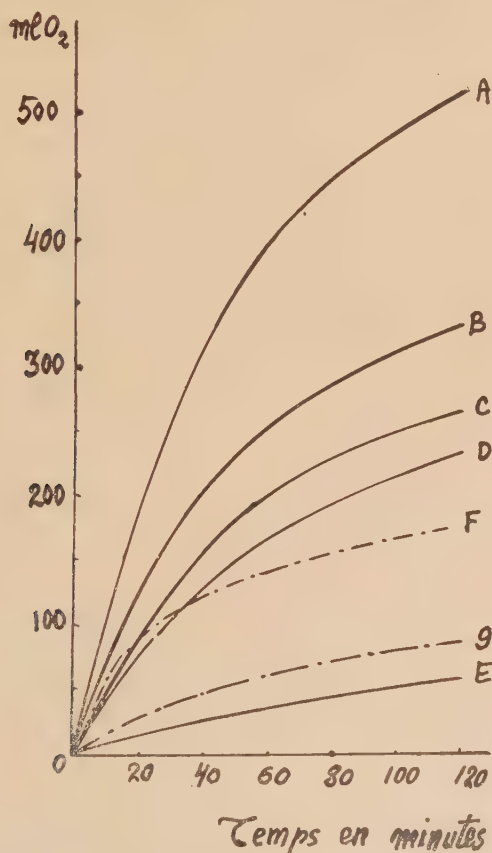


FIG. 5. — *Cl. saccharobutyricum*. Consommation d'O<sub>2</sub> en fonction de la densité bactérienne; A, 30  $\mu$  mols alanine + 1 ml. suspension (6,58 mg. N); B, 30  $\mu$  mols alanine + 0,8 ml. suspension; C, 30  $\mu$  mols alanine + 1 ml. suspension; D, 30  $\mu$  mols alanine + 0,30 ml. suspension; F, témoin 1 ml. suspension; G, témoin 0,5 ml. suspension.

nine, valine, cystéine, sérine, thréonine, glutamate et aspartate. Acides aminés attaqués sans consommation d'oxygène : histidine et arginine. Acides aminés non attaqués à l'air : glycine, proline et ornithine.

ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES SUSPENSIONS. — On constate ici les mêmes faits que ceux rapportés pour les suspensions de *Cl. spo-*

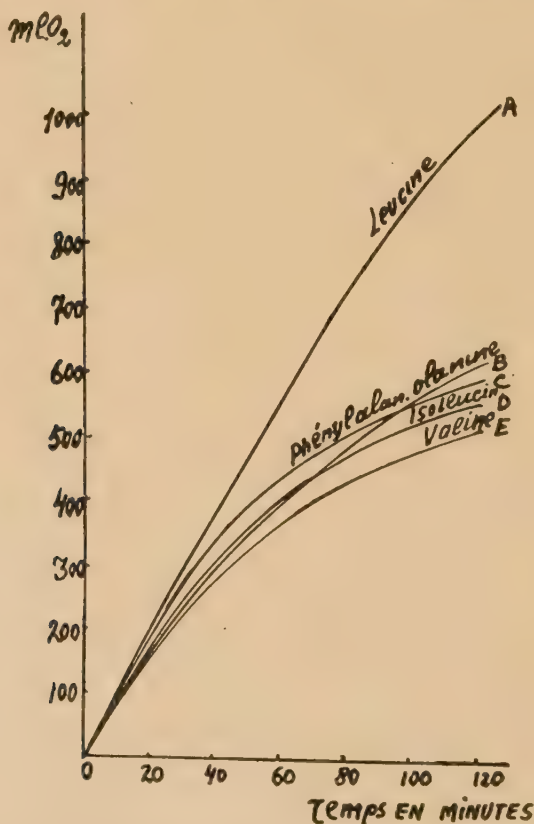


FIG. 6. — *Cl. saccharobutyricum*. Vitesse de dégradation des substrats : 80  $\mu$  mols de substrat + 1 ml. suspension (7 mg. N).

rogenes. Les figures 5 et 6 représentent la consommation d'oxygène des suspensions de cette bactérie avec ou sans substrat.

L'EFFET DE LA DILUTION DES SUSPENSIONS SUR L'OXYDATION DES ACIDES-AMINÉS. — Les suspensions denses (5-6 mg. d'N par millilitre) oxydent les acides aminés rapidement. Les suspensions

diluées présentent une activité infiniment moindre et sans proportionnalité avec la dilution. Ces faits ont été d'abord remarqués par Krebs [17] avec la *l*-amino-acide-oxydase de tissu de mammifères. Cet auteur supposait la présence de corps inhibiteurs dans les extraits qui inactivent les enzymes responsables de l'oxydation des acides aminés.

TABLEAU IX. —  $O_2/NH_3$  (*Cl. saccharobutyricum*).

30  $\mu$  mols d'acide aminé dans du tampon phosphate M/15 pH 7,1 + 1 ml. de suspension bactérienne (N = 6 mg.). Volume total 3,0 mls. Dans la partie centrale 0,2 ml. de KOH à 10 p. 100. Durée de l'expérience : quatre-vingt-dix minutes.  $NH_3$  et  $O_2$  exprimés en  $\mu$  mols. Phase gazeuse : air. Température 37° C.

SUBSTRAT	$O_2$	$NH_3$	$O_2/NH_3$
Alanine. . . . .	26,5	27,2	0,97
Leucine (1). . . . .	16,1	28,4	0,6
Norleucine . . . . .	23,2	28,5	0,8
Isoleucine . . . . .	18,7	22,4	0,83
Valine (2). . . . .	9,2	16,5	0,55
Phénylalanine . . . . .	16,2	21,0	0,77
Méthionine. . . . .	16	32	0,5
Cystéine (3). . . . .	20	24	0,87
Sérine . . . . .	12	30	0,4
Thréonine . . . . .	16	28	0,57
Glutamate . . . . .	10	30	0,33
Aspartate. . . . .	11	33	0,33

(1), (2) On trouve dans certaines conditions pour ces deux substrats des rapports  $O_2/NH_3 = 1$ .  
 (3) Le cas de la cystéine sera étudié dans un prochain mémoire. Toutefois les mêmes remarques s'imposent que celles notées au tableau I, page 281.

CONSOMMATION D'OXYGÈNE. — Il ressort du tableau IX que les acides aminés suivants consomment environ un atome d'oxygène par molécule d'acide aminé : méthionine, sérine, thréonine, valine, leucine et cystéine. Les acides aminés tels que : isoleucine, norleucine, phénylalanine, alanine et cystéine absorbent deux atomes d' $O_2$  par molécule de substrat. Pour l'aspartate et le glutamate,  $O_2/NH_3 < 0,5$ .

$Q_{O_2}^N$  (fig. 6). L'expérience suivante réalisée en présence d'excès de substrat rapporte nos résultats à ce propos. On voit que la leucine consomme plus d'oxygène par milligramme d'N et par heure que les autres acides aminés. Suivent la méthionine, la phénylalanine, l'isoleucine, l'alanine et la valine.



TABLEAU X. —  $Q_{O_2}^N$  des suspensions de *Cl. saccharobutyricum* pour les différents acides aminés.

Chaque cupule contient 100  $\mu$  mols. de substrat dans du tampon phosphate M/15 pH 7,1 + 1 ml. de suspension de *Cl. saccharobutyricum*. Volume total 3,0 mls. Dans la partie centrale 0,2 ml. de KOH à 10 p. 100. Durée de l'expérience cent quatre-vingt minutes. Température 37° C. Phase gazeuse : air. Résultats exprimés en millimètre cube d'O<sub>2</sub> par miligramme d'N bactérien.

SUBSTRATS	$Q_{O_2}^N$
Leucine . . . . .	70
Méthionine . . . . .	58
Phénylalanine . . . . .	52
Isoleucine . . . . .	46
Valine . . . . .	42
Analine . . . . .	44

PRODUITS DE LA RÉACTION. — Ici également on arrive à isoler les acides  $\alpha$ -cétoniques des acides aminés suivants : leucine, isoleucine, norleucine, méthionine, valine et phénylalanine. Pour les acides aminés tels que : alanine, sérine, cystéine, glutamate et aspartate, l'addition de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans le milieu réactionnel donne une coloration rouge par addition de soude. Les 2-4 dinitrophénylhydrazones toutefois se trouvent en quantité trop faible, et nous n'avons pas poursuivi leur isolement.

TABLEAU XI. —  $\frac{RCOCOOH}{NH_3}$ , en présence et en absence de catalase.

30  $\mu$  mols. d'acide aminé dans du tampon pH 7,1 M/15 + 1 ml. de suspension bactérienne (N = 5,6 mg.). Volume total 3,0 ml. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH à 10 p. 100. Phase gazeuse : air. Durée de l'expérience : cent vingt minutes. Température : 37° C. Résultats exprimés en  $\mu$  mols.

	SANS CATALASE			$\frac{RCOCOOH}{NH_3}$	O <sub>2</sub>	AVEC CATALASE		
	O <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	RCOCOOH			NH <sub>3</sub>	RCOCOOH	$\frac{RCOCOOH}{NH_3}$
Alanine . . . . .	15,1	19,2	1,1	0,05	15,2	17	1,5	0,08
Leucine . . . . .	16	27	5	0,19	18	30	4,6	0,15
Valine . . . . .	13	22	3,2	0,14	14	23,6	3,2	0,11
Isoleucine . . . . .	9,4	21,2	1,9	0,1	22,1	25,2	2,3	0,09
Méthionine . . . . .	16	19,2						
Phénylalanine . . . . .	19	22	3	0,13	17	20	2,6	0,13
Thréonine . . . . .	14	30	4,2	0,3				

ACIDES  $\alpha$ -CÉTONIQUES.NH<sub>3</sub>.

— On peut voir d'après les données du tableau précédent, que les acides  $\alpha$ -cétoniques se trouvent en petites quantités sans rapport avec l'NH<sub>3</sub> dégagé. La disparition des acides  $\alpha$ -cétoniques peut, dans ce cas également, être interprétée comme un phénomène enzymatique, le tableau XI montrant que la catalase en excès est sans action sur la quantité d'oxygène absorbé, les acides  $\alpha$ -cétoniques sont aussi bien dégradés en présence qu'en absence de catalase. Les faits suivants appuient également ces vues : a) le pyruvate de Na est dégradé oxydativement par les suspensions de *Cl. saccharobutyricum* (fig. 4) ; b) l'acide monoiodoacétique inhibe le catabolisme du pyruvate par ces mêmes suspensions à l'air.

*Remarque.* — Il a été relaté antérieurement que *Cl. saccharobutyricum* dégrade la leucine et la valine, consommant un atome d'oxygène par molécule d'acide aminé. Il arrive cependant, pour certaines suspensions plus denses obtenues dans les mêmes conditions, qu'elles consomment deux atomes d'O<sub>2</sub> par molécule de substrat. Ces faits peuvent s'expliquer si l'on admet que les enzymes dégradant les acides  $\alpha$ -cétoniques sont inactivés dans le premier cas, tandis que, dans le second, ils sont actifs [14].

LA RECHERCHE DE L'EAU OXYGÉNÉE. — Avec les acides aminés qui consomment deux atomes d'oxygène, la catalase en excès (tableau XI) ne diminue pas la quantité d'O<sub>2</sub> absorbé. L'oxydation couplée avec l'éthanol est négative en ce sens qu'il n'y a pas d'augmentation de l'oxygène consommé en présence du système : suspension *Cl. saccharobutyricum* + alanine + éthanol + catalase, alors que l'éthanol seul consomme beaucoup d'O<sub>2</sub>. Il n'y a donc pas d'eau oxygénée.

TABLEAU XII.

- 1 — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne (N : 5,6).
- 2 — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne + 20  $\mu$  mols. d'acide aminé.
- 3 — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 1 ml. de suspension bactérienne + 20  $\mu$  mols. d'acide aminé + 0,2 ml. de catalase.
- 4 — 20  $\mu$  mols. d'acide aminé + 0,2 ml. de catalase.
- 5 — 20  $\mu$  mols. d'éthanol + 0,2 ml. de catalase + 1 ml. de suspension bactérienne.
- 6 — 20  $\mu$  mols. d'acide aminé + 1 ml. de suspension bactérienne.  
M/15 pH 7,1.

On complète à 3,0 mls. par du tampon phosphate. Dans la partie centrale, 0,2 ml. de KOH. Durée de l'expérience : quatre-vingt-dix minutes. Température : 37°. O<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub> sont exprimés en  $\mu$  mols.

	O <sub>2</sub>	NH
	—	—
1 . . . . .	7,6	
2 . . . . .	25,8	19,9
3 . . . . .	28,0	21,2
4 . . . . .	19,8	20,5
5 . . . . .	9,1	
6 . . . . .	18,1	19,7

L'acide aminé = phénylalanine.

ACIDES VOLATILS FORMÉS. — *Cl. saccharobutyricum* produit en culture les acides butyrique et acétique. On n'arrive pas à caractériser chez cette bactérie en anaérobiose des acides volatils supérieurs à l'acide butyrique. En aérobiose, nous avons par contre pu constater la formation d'acide isobutyrique à partir de la valine (voir tableau XIII).

TABLEAU XIII.

Formation des acides volatils à partir des acides aminés en aérobiose (*Cl. saccharobutyricum*).

Pour les conditions expérimentales, se rapporter aux détails techniques exposés dans la première partie de ce travail. Résultats exprimés en  $\mu$  mols.

SUBSTRAT	NATURE des acides formés	NH <sub>3</sub> APPARU	RCOCOOH	ACIDITÉ volatile totale	RAPPORTS
Valine . . . . .	Isobutyrique acétique	383	28	568	2/1

Les réactions qui ont eu lieu à l'air doivent être du même type que celles décrites précédemment, soit :

$$1^{\circ} \text{ RCHNH}_2\text{COOH} + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{RCOCOOH} + \text{NH}_3.$$

$$2^{\circ} \text{ RCOCOOH} + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{RCOOH} + \text{CO}_2.$$

ACTION DES INHIBITEURS. — L'alcool isoocetylique, le monoiodo-acétate de Na et le cyanure de Na inhibent la dégradation oxydative des acides aminés. Le fluorure de Na, l'arsénite de Na et le monofluoroacétate de Na et l'azoture de Na n'ont aucune action (voir tableau XIII bis).

TABLEAU XIII bis.

Action des inhibiteurs sur l'oxydation de la leucine et de l'alanine par les suspensions de *Cl. saccharobutyricum*. Résultats exprimés en p. 100 d'inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> et du dégagement d'NH<sub>3</sub>.

INHIBITEURS EN CONCENTRATION FINALE	POURCENTAGE d'inhibition	
	NH <sub>4</sub>	O <sub>2</sub>
HCN M/300 . . . . .	50	50
Alcool isooclylique en solution saturée . . . . .	100	100
FNa M/100 . . . . .	5	5
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> M/1.000 . . . . .	28	15
FCH <sub>3</sub> COOH M/60 . . . . .	0	0
ICH <sub>3</sub> COOH M/200 . . . . .	76	76
Benzoate de Na M/96 . . . . .	0	0
Pénicilline 6.000 U.I./ml. . . . .	0	0
N <sub>3</sub> Na M/75 . . . . .	0	0

COMPARAISON ENTRE LA DÉSAMINATION EN AÉROBIOSE ET EN ANAÉROBIOSE. — Cette bactérie dégrade en anaérobiose les acides aminés suivants : le glutamate, l'aspartate, l'histidine, la sérine, la méthionine, la cystéine, l'arginine et la thréonine alors que la valine, la leucine, la norleucine, l'isoleucine, la phénylalanine et l'alanine ne sont pas touchées. A l'air, ces derniers le sont contrairement à ce qui se passe en anaérobiose.

RÉPARTITION DES AMINO-ACIDE-OXYDASES CHEZ LES ANAÉROBIES STRICTS. — La recherche de l'existence d'enzymes semblables a été effectuée avec d'autres anaérobies stricts du groupe des clostridies. Toutes les bactéries étudiées pour décèler cette activité enzymatique (envers la leucine et l'alanine) nous ont donné des résultats positifs :

TABLEAU XIV.

Bactéries anaérobies strictes possédant des enzymes l-amino-acide-oxydasiques.

*Cl. sporogenes.*  
*Cl. saccharobutyricum.*  
*Cl. acetobutylicum.*  
*Cl. mitelmani.*  
*Cl. aerofoetidum.*  
*Cl. histolyticum.*  
*W. perfringens.*  
*Pl. tetani.*

Certaines de ces bactéries dont : *W. perfringens*, *Pl. tetani* et *Cl. saccharobutyricum* ne donnent pas la réaction de Stickland. Les autres bactéries du même tableau donnent cette réaction [2].



TABLEAU XV. — Acides aminés  
attaqués par différents systèmes *l*-amino-acide-oxydasiques.

	<i>Cl. saccharobutyricum</i>	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>Vipera aspis</i>	<i>P. vulgaris</i>		<i>L</i> -AMINO-ACIDE-OXYDASES des mammifères
				Suspensions	Enzymes	
Alanine . . . . .	+	+	+	+	0	++
Valine . . . . .	+	+	+	+	0	++
Leucine . . . . .	+	+	+	+	+	++
Norleucine . . . . .	+	+	+	+	+	++
Isoleucine . . . . .	+	+	+	+	+	++
Phénylalanine . . . . .	+	+	+	+	+	++
Tryptophane . . . . .	—	—	+	+	+	++
Cystéine . . . . .	+	+	+	+	0	
Sérine . . . . .	+	+	0	+	0	
Thréonine . . . . .	+	+	0	+	0	
Glutamate . . . . .	+	0	0	0	0	0 0
Aspartate . . . . .	+	+	0	0	0	0 0
Arginine . . . . .	0	0	0	+	+	++
Ornithine . . . . .	0	0	0	+	+	++
Histidine . . . . .	0	0	+	+	+	++
Citrulline . . . . .	—	—	+	—	—	
Glycine . . . . .	0	0	0	+	0	++
Proline . . . . .	0	0	0	+	+	+

A la différence de la *l*-amino-acide-oxydase des mammifères qui attaquent la proline, l'arginine et l'ornithine, les enzymes des bactéries anaérobies strictes n'attaquent pas ces acides aminés.

La *l*-ophi-amino-acide-oxydase se comporte à cet égard pareillement, elle n'attaque pas cependant les acides monoaminés dicarboxyliques. Notons que *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*

TABLEAU XVI. — Action des inhibiteurs  
dans les différents systèmes *l*-amino-acide-oxydasiques.

	<i>P. vulgaris</i>	<i>Cl. saccharobutyricum</i>	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>L</i> -AMINO ACIDE-OXYDASE (6)	<i>Vipera aspis</i>
Benzoate de Na M/100 . . . . .	0	0	0	0	+ —
ICH <sub>3</sub> COOH M/200 . . . . .	+	+	0	0	+ —
FCH <sub>3</sub> COOH M/60 . . . . .	—	0	0	0	0
HCN M/300 . . . . .	+	+	+	0	0
Alcool octylique secondaire, solution saturée . . . . .	+	+	+	0	0



Le mécanisme est donc essentiellement analogue dans les deux cas.

En anaérobiose, ce qui constitue la particularité des anaérobies, c'est le fait qu'un acide aminé (glycine ou proline) peut être réduit enzymatiquement par l'hydrogène. Ceci toutefois n'est pas un phénomène général, car parmi les clostridies, il existe un nombre important d'espèces qui ne peuvent pas utiliser l'acide aminé (glycine, proline) comme accepteur d'hydrogène. Ces faits jettent une nouvelle lumière sur les enzymes effectuant la réaction de Stickland chez les anaérobies. Elles permettent d'envisager avec une grande probabilité l'existence de deux enzymes effectuant ce couplage oxydo-réducteur concernant la désamination [22] :

I. — ENZYMES INTERVENANT DANS LA DÉSHYDROGÉNATION DE L'ACIDE AMINÉ DONATEUR ÉTANT DE TYPE *l*-AMINO-ACIDE-OXYDASIQUE. — Les *l*-amino-acide-oxydases [1] sont des enzymes qui subissent une réduction par l'hydrogène du substrat acide aminé et une réoxydation par l'oxygène moléculaire. Les enzymes réduits peuvent être réoxydés soit par un colorant oxydo-réducteur tel que le B. de M. (entre autres) ou encore par O<sub>2</sub>. Cette sorte d'enzymes se rencontre aussi bien dans les tissus (rein et foie des organismes supérieurs), venin de serpent, que chez les êtres inférieurs tels que *Neurospora crassa* [13] (*d*-amino-acide-oxydase), *P. vulgaris* (*l*-amino-acide-oxydase) [12].

Selon la spécificité de l'enzyme, elles sont appelées *d*- ou *l*-amino-acide-oxydases. Des enzymes semblables existent comme nous venons de le montrer chez les anaérobies *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*.

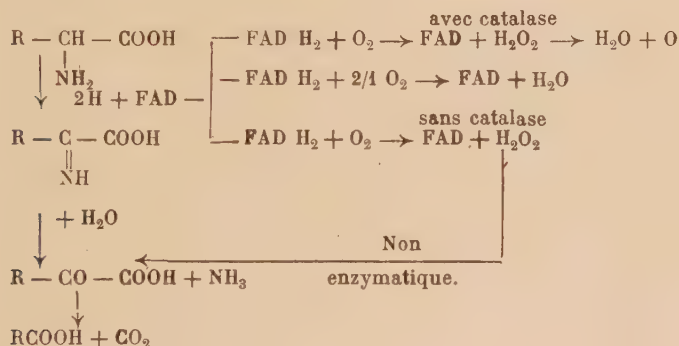
II. — Le deuxième système enzymatique intervenant dans la réaction de Stickland est l'enzyme qu'effectue le transfert de H<sub>2</sub> sur l'acide aminé accepteur d'hydrogène. Il existe chez *Cl. sporogenes* et n'existe pas chez *Cl. saccharobutyricum*. Ceci constitue la différence de métabolisme des acides aminés chez ces deux bactéries. Elle se trouve chez les bactéries donnant la réaction de Stickland. Cet enzyme serait d'après nous une hydrogénase, pouvant utiliser l'hydrogène provenant de la déshydrogénation des substrats acides aminés ou non, et pouvant, en outre, réduire des acides aminés accepteurs d'hydrogène de formes *d* ou *l* comme il a été montré par Woods [19].

#### DISCUSSION.

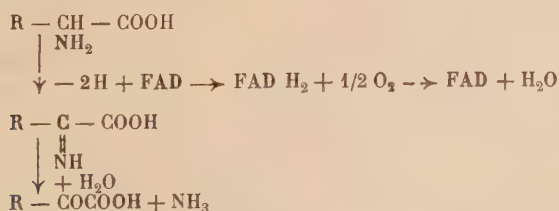
Les *l*- et *d*-amino-acide-oxydases connues sont des enzymes constitués généralement d'un groupement prosthétique à base de flavine (FAD = flavine-adénine-dinucléotide) et d'une protéine. On définit généralement les amino-acide-oxydases comme des

enzymes qui subissent une réduction par l'hydrogène provenant de la déshydrogénation du substrat et une réoxydation par l'oxygène moléculaire. C'est dans ce sens que nous avons assimilé les enzymes attaquant les acides aminés (alanine, leucine, norleucine, valine et isoleucine (2) en aérobiose chez les bactéries anaérobies à des *l*-amino-acide-oxydases. Il est généralement admis que l'acide aminé est déshydrogéné en présence de l'enzyme en acide aminé et que ce dernier étant instable est transformé non enzymatiquement en présence de  $H_2O$  en acide  $\alpha$ -cétonique. Le mode d'action des *l*-amino-acide-oxydases doit être schématisé comme suit, selon le type de l'enzyme décrit :

*l*-amino-acide-oxydase des mammifères (rein et foie) Blanchard, Green, Nocito et Ratner [6], ainsi que *l*-ophy-amino-acide-oxydase de Zeller et al. [16].



La *l*-amino-acide-oxydase de *P. vulgaris* qui a été isolée par Stumpf et Green [12] par ultrasonation, quoique ayant un groupement prosthétique à base de flavine, ne forme pas de  $H_2O_2$  lors de la réoxydation par l'oxygène moléculaire. Le mécanisme de cet enzyme est :



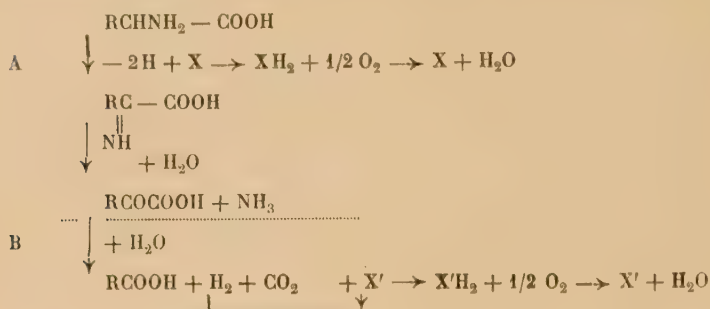
On connaît également d'autres amino-acide-oxydases telles que la *d*-amino-acide-oxydase de *Neurospora crassa* [13] qui ne forme

(2) Nous reviendrons ultérieurement sur le cas de la sérine, cystéine, méthionine et thréonine.



pas de  $H_2O_2$  et dont le groupement prosthétique est inconnu, et la *d*-amino-acide-oxydase de *P. Morganii* [21] extraite par ultrasonation dont le groupement prosthétique n'est pas une flavo-protéine.

En ce qui concerne le mode d'action des enzymes existant chez les deux bactéries anaérobies, on peut admettre, en accord avec les données de la littérature et avec nos propres expériences, le mécanisme suivant :



Nous avons vu que l'acide  $\text{ICH}_2\text{COOH}$  n'inhibe pas le système A mais inhibe le système B chez *Cl. sporogenes*, cependant le même inhibiteur inactive les deux systèmes chez *Cl. saccharobutyricum*. Ce schéma explique pourquoi certains traitements comme le lavage prolongé des bactéries peut inactiver B et laisser intact A [14]. Il explique encore pourquoi la catalase ne diminue pas l'oxygène consommé, ainsi qu'elle n'empêche pas l'oxydation des acides  $\alpha$ -cétoniques formés.

En remplaçant l'accepteur d'hydrogène qui, en aérobiose, est l'oxygène par le B. de M. ou un autre colorant d'oxydo-réduction, ou encore par le système enzymatique réduisant la glycine, l'ornithine ou la proline en anaérobiose, on voit que ce mécanisme est partiellement identique à celui mis en jeu pour la réaction de Stickland chez *Cl. sporogenes*, ce qui plaide en faveur de l'identité, au moins partielle, de systèmes enzymatiques en aérobiose et anaérobiose chez les bactéries anaérobies strictes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1746 ; *ibid.*, 1935, **29**, 288, 889, 896.
- [2] NISMAN (B.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.). *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 473.
- [3] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Comm. VIII<sup>e</sup> Congrès Chim. Biol.*, Paris, 1948 (sous presse).
- [4] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Biochim. et Biophys. Acta*, 1949, **3**, 348.

- [5] NEGELEIN (E.) et BRÜMEL (H.). *Biochem. Z.*, 1939, **300**, 225.
- [6] BLANCHARD (M.), GREEN (D. E.), NOCITO (V.) et RATNER (S.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, 421.
- [7] RAYNAUD (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 713.
- [8] CLIFT (F. B.) et COOK (R. P.). *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1788.
- [9] KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 148 ; *ibid.*, 1945, **39**, 293.
- [10] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, Masson, édit., Paris, 1948.
- [11] HOLLEMAN (M. A. F.). *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1908, **23**, 169.
- [12] STUMPF (P. K.) et GREEN (D. E.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 387.
- [13] HOROWITZ (N. H.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **154**, 141.
- [14] NISMAN (B.) et VINET (G.). Résultats non publiés.
- [15] COHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G. N.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 291.
- [16] ZELLER (E. A.). *Advances in Enzymology*, 1948, vol. 8.
- [17] KREBS (H. A.). *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1620.
- [18] KREBS (H. A.). *The Relation of optical form to biological activity in the amino-acid series. Biochemical Society symposia*, Cambridge, 1948, n° 1.
- [19] WOODS (D. D.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1934.
- [20] HOOGERHEIDE et KOCHOLATY. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 949 ; *Ibid.*, *Biochem. J.*, 1938, **32**, 448.
- [21] STUMPF (P. K.) et GREEN (D. E.). *Feder. Proc.*, 1946, **5**, 157.
- [22] NISMAN (B.) et VINET (G.). *Ces Annales* (sous presse).

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.)

Séance du 7 Juillet 1949.

Présidence de M. MAGROU.

---

## PRÉSENTATION D'OUVRAGES

**Samson Wright.** — *Applied Physiology*, Oxford University Press (eighth edition), XXX + 944 pages, 15 × 22 cm.

Voici la huitième édition depuis 1926 de l'ouvrage désormais classique du Professeur S. Wright. Il est à peine besoin de dire que cette édition ne le cède en rien en qualité à ses précédentes, mais qu'au contraire la présentation et les illustrations en ont encore été améliorées. Un soin particulier a été donné à la physiologie nerveuse et aux acquisitions modernes dans ce domaine. Notons également les chapitres très intéressants de physiologie appliquée à des problèmes récents ou d'actualité tels que l'hémorragie et le syndrome d'écrasement de Bywaters, les brûlures, etc. De même, la physiologie de l'organisme aux hautes altitudes, au froid, ou sous l'influence de différents régimes alimentaires a reçu les développements appropriés. Dans le domaine de la physiologie où abondent les livres, il n'en est peut-être pas d'autres qui aient su présenter autant de faits essentiels d'une façon à la fois aussi claire et aussi concentrée. Cette nouvelle édition est appelée, comme les précédentes, à un succès prolongé.

P. L.

**Raymond Daley et Henry G. Miller.** — *Progress in Clinical Medicine*, J. et A. Churchill Ltd., 104, Gloucester Place, London W. 1, 24 × 16 cm., XI + 356 pages, 22 figures et 15 planches.

R. Daley et H. G. Miller présentent avec un groupe d'auteurs des questions d'actualité touchant la chimiothérapie, les maladies vénériennes, la médecine tropicale, les maladies du tractus gastro-intestinal, les troubles du métabolisme (diabète, stéatorrhée, goutte), les maladies cardiovasculaires, rénales, les maladies du sang et du poumon, celles du système nerveux et du système endocrine, enfin la médecine psychosomatique et les rhumatismes chroniques. Destinées surtout aux cliniciens, ces études claires et concises sont d'une nature intéressante. Une bibliographie réduite accompagne les articles.

P. L.

**Sydney Smith et Frederick Smith Fiddes.** — *Forensic Medicine* (Ninth Edition), J. et A. Churchill Ltd, 104, Gloucester Place, London W. 1, 15 × 22,5 cm., XII + 659 pages, 173 illustrations.

Clair, abondamment documenté et illustré, le traité de médecine légale de Smith et Fiddes voit aujourd'hui sa neuvième édition. Il peut être considéré comme un modèle du genre, tant par le soin de la rédaction que par l'étendue du sujet traité. Si la partie strictement juridique intéresse surtout les pays de droit britannique, les méthodes d'expertise légale, notamment en ce qui concerne le diagnostic des empoisonnements, sont d'application universelle et le livre pourra être consulté avec fruit.

P. L.

**Geoffrey Keynes.** — *Blood Transfusion*, John Wright and sons Ltd, Bristol ; Simpkin Marshall Ltd, London, 15 × 22 cm., XII + 574 pages.

Livre d'actualité s'il en fut, ce livre traite de la transfusion sanguine depuis les temps historiques jusqu'aux techniques les plus récentes (banque de sang, plasma desséché, etc.). Une riche illustration en rend la lecture particulièrement claire. Une abondante bibliographie termine chaque chapitre. C'est un livre à recommander entre tous ceux qui traitent la question.

P. L.

**A. Piney et J. L. Hamilton-Paterson.** — *Sternal Puncture* (4<sup>e</sup> édition), William Heinemann, Medical Books Ltd, London, 1949, 14,5 × 22 cm., XV + 99 pages, 14 planches en couleurs.

La méthode de la ponction sternale s'est particulièrement développée pour l'étude des anémies : cette technique, ses indications, ses résultats sont clairement décrits dans ce précis complété par une remarquable illustration en couleurs qui donne de chacun des états décrits des images particulièrement typiques.

P. L.

**Alfred T. Cowie.** — *Pregnancy Diagnosis Tests : A Review*, Commonwealth Agricultural Bureaux, joint publication N° 13, Edinburg, 14,5 × 22 cm., 283 pages.

L'auteur passe en revue les différentes méthodes médicales ou vétérinaires qui ont été proposées pour le diagnostic de la grossesse. Chacune d'elles est analysée en détail et il y a 100 pages de bibliographie, ce qui en fait un excellent livre de références sur ce sujet.

P. L.

**Onorato Verona.** — *Nutrizione e Malattie nelle Piante Coltivate* (2<sup>e</sup> édition), Arti Grafiche Tornar, Pisa, 1949, 15 × 21,5 cm., 222 pages (850 liras ; 1,50 dollar).

Le professeur Verona nous donne aujourd'hui une deuxième édition de son livre sur la nutrition et les maladies des plantes domestiques.



Conçu sous la forme de précis, il étudie systématiquement l'influence des métalloïdes et des métaux participant normalement ou exceptionnellement à la composition des sols sur la croissance des plantes cultivées et leur rendement. Des figures particulièrement démonstratives montrent ainsi ce que l'adjonction ou la privation des éléments étudiés peut entraîner comme conséquences au point de vue de l'agriculture et de ses produits. Dix-huit planches hors texte dont une bonne part en couleurs contribuent ainsi à l'illustration de ce livre agréable et clair où tout biologiste trouvera beaucoup à glaner.

P. L.

**T. A. Longmore.** — *Medical Photography* (4<sup>e</sup> édition), The Focal Press, 31, Fitzroy Square, London W., 381, Fourth Avenue, New-York, 13 x 19 cm., 1.008 pages.

Voici un livre précieux pour le photographe, qu'il soit ou non médecin. Toute la technique de la photographie scientifique est longuement exposée, de la macro à la microphotographie. Les illustrations sont abondantes et claires. Le livre se consulte facilement comme un dictionnaire. Les températures, poids, etc., dans les formules, sont indiqués en mesures métriques en même temps qu'en mesures anglaises. Un glossaire termine ce livre excellent où le médecin comme le photographe apprendront bien des choses.

P. L.

**P. L. Mollison, A. E. Mourant et R. R. Race.** — *The Rh Blood Groups and Their Clinical Effects*, His Majesty's Stationery Office, Londres, 1948, Medical Research Council, Memorandum n° 19.

**E. M. Hume et A. Krebs.** — *Vitamin A Requirement of human adults an experimental Study of Vitamin A Deprivation in man. A Report of the Vitamin A sub-committee of the accessory food factors committee*, Medical Research Council, special report series n° 264, His Majesty's Stationery Office, London, 1949.

**J. N. Agate, G. H. Bell, G. F. Boddie, R. G. Bowler, Monamy Buckel, E. A. Cheseman, T. H. J. Douglas, H. A. Druett, Jessie Garad, Donald Hunter, K. M. A. Perry, J. D. Richardson et J. B. de V. Weir.** — *Industrial fluorosis, a study of the hazard to man and animals near fort William Scotland*, Medical Research Council, Memorandum n° 22, His Majesty's Stationery Office, 1949.

**Edward D. Hoare.** — *The Sulphonamides in General Practice*, Staples Press Limited, London, 1949.

**William Hale-White.** — *Materia Medica, Pharmacy-Pharmacology and Therapeutics*, J. et A. Churchill Ltd, London, 1949.

**A. R. Friel.** — *Zinc ions in Ear, Nose and Throat Work*, John Wright and sons Ltd, Bristol ; Simpkin Marshall (1941) Ltd, London, 1948.

**M. C. G. Israels.** — *An atlas of Bone-Marrow Pathology*, William Heinemann, Medical Books Ltd, London, 1948.

*Proceedings of the International Congress on Population and World resources in relation to the Family*, Cheltenham, England, August 1948, published for the Family Planning Association of Great Britain, by H. K. Lewis and Co Ltd, London.

## COMMUNICATIONS

### **SUR L'EMPLOI DU CAMPHRE POUR ACCROITRE LA SENSIBILITÉ DES ANTIGÈNES SYPHILITIQUES**

par L. SAINT-PRIX et S. MUTERMILCH.

On connaît depuis longtemps des substances capables d'augmenter la sensibilité des divers antigènes employés pour le sérodiagnostic de la syphilis ; tels sont, notamment : le cholestérol, la lécithine et le baume de tolu. Il était à prévoir que d'autres substances pourraient s'ajouter à cette liste.

Dans cette première note, nous relatons les résultats obtenus avec le *camphre*, dont il existe dans le commerce des produits d'origine et de fabrication diverses : camphre du Japon, du Brésil, de Bornéo et camphres synthétiques.

L'étude préliminaire de ces divers échantillons nous a montré que leur activité, en général constante, varie cependant d'un échantillon à l'autre, et que les impuretés contenues dans ces produits sembleraient, à ce point de vue, jouer un rôle important.

Dans les expériences dont l'exposé suit, il a été fait usage d'un camphre synthétique du commerce, dilué dans l'alcool à 90° en proportion de 10 p. 100, et le pouvoir sensibilisant de cette teinture a été expérimenté vis-à-vis du tolu-antigène employé pour la réaction d'opacification de Meinicke (1), tout en nous réservant de faire ultérieurement une étude similaire pour divers autres antigènes et pour divers produits du groupe camphre. La quantité d'alcool camphré ajoutée au tolu-antigène a été de 0,18 cm<sup>3</sup> pour 1 cm<sup>3</sup>, dose optimum.

La technique de la séro-réaction fut ensuite identique à celle de Meinicke : deux tubes, par réaction, reçoivent chacun 0,2 cm<sup>3</sup> de sérum frais, le tube témoin reçoit, en outre, 1 goutte de formol du commerce ; les deux tubes reçoivent alors 1 cm<sup>3</sup> de la suspension obtenue par le mélange rapide de 1 cm<sup>3</sup> d'antigène camphré et 10 cm<sup>3</sup> d'eau salée à 3 p. 100, après leur chauffage préalable pendant dix minutes au bain-marie à la température de 45°. On agite et on laisse les tubes à la température du laboratoire jusqu'au lendemain.

Les sérums très positifs commencent à se troubler déjà au bout de quelques minutes, et l'on constate le lendemain une clarification complète du mélange avec formation d'un dépôt volumineux.

Les sérums faiblement positifs donnent une opacification plus ou

(1) Nous nous sommes servi du tolu-antigène de la « Biothérapie ».

moins intense au bout de trois, six, huit, dix-huit heures avec formation d'un précipité d'importance variable.

Les sérums négatifs montrent une transparence égale à celle du tube témoin.

541 sérums ont été examinés au moyen de cette nouvelle réaction, comparativement aux réactions de Vernes (2), Hecht-Mutermilch, Meinicke (opacification) et Kahn ; voici les résultats obtenus :

1° 414 sérums provenant de sujets sains ou atteints de diverses affections *non syphilitiques* se sont montrés négatifs par toutes les réactions sérologiques employées.

2° 64 sérums provenant de sujets *atteints de syphilis*, récente ou ancienne, traités ou non traités, se sont montrés positifs avec toutes les réactions sérologiques employées.

3° 58 sérums provenant de sujets *syphilitiques*, pour la plupart en cours de traitement, ont donné des résultats *discordants* que l'on peut résumer dans le tableau ci-dessous :

Hecht-Mutermilch . . . . .	16 positifs, soit 27,6 p. 100
Kahn . . . . .	36 — 62,1 —
Vernes . . . . .	43 — 74,1 —
Meinicke . . . . .	23 — 39,6 —
Antigène camphré . . . . .	53 — 91,4 —

4° 5 sérums provenant de sujets présumés *non syphilitiques* ont fourni des résultats *non spécifiques* par une ou plusieurs techniques, comme il ressort du tableau ci-dessous :

SÉRUM	HECHT-MUTERMILCH	KAHN	VERNES	MEINICKE	CAMPFIRE	DIAGNOSTIC
1	<i>n</i>	<i>n</i>	0 + 1	<i>n</i>	±	Confusion mentale.
2	<i>n</i>	++		±	++	Dépression mentale; tares héréditaires.
3	<i>n</i>	<i>n</i>		±	±	Confusion mentale.
4	<i>n</i>	<i>n</i>		<i>n</i>	±	Démence sénile.
5	<i>n</i>	+	0 — 16	<i>n</i>	+++	Etat anxieux.

Le pourcentage des réactions présumées non spécifiques, par rapport au nombre total des sérums examinés, s'établit donc pour chacune des réactions de la façon suivante :

Hecht-Mutermilch . . . . .	0 p. 100
Kahn . . . . .	0,36 —
Vernes . . . . .	0,18 —
Meinicke . . . . .	0,36 —
Antigène camphré . . . . .	0,90 —

Il est à noter, cependant, que certains de ces sérums ont fourni des

(2) Nous adressons nos remerciements à l'Institut Prophylactique du Dr Vernes, qui a bien voulu mettre à notre disposition des sérums et les dossiers des malades.

résultats plus ou moins positifs avec 2 ou même 3 techniques, et qu'ils proviennent de cas mentaux où l'étiologie syphilitique ne peut pas être écartée de façon certaine.

CONCLUSIONS. — 1° L'alcool camphré, ajouté au tolu-antigène, augmente considérablement sa sensibilité pour la réaction d'opacification de Meinicke.

2° La réaction d'opacification avec le tolu-antigène camphré se classe comme la plus sensible de toutes les réactions d'hémolyse et de floculation étudiées ; par ordre décroissant de sensibilité viennent ensuite la réaction de Vernes, celle de Kahn, celle d'opacification de Meinicke et celle de Hecht.

3° La spécificité de la réaction au tolu-antigène camphré est comparable à celle des diverses techniques sérologiques classiques.

(Hôpital Henri-Rousselle.)

## **SUR UN APPAREIL « SÉPARATEUR DE GERMES » POUVANT DANS CERTAINS CAS REEMPLACER LES MICROMANIPULATEURS**

par PAUL HAUDUROY.

Il existe à l'heure actuelle nombre d'appareils producteurs d'aérosols permettant d'obtenir des brouillards non mouillants dont les gouttelettes ont des diamètres de l'ordre de 1/1.000 de millimètre.

Il est possible d'utiliser ces appareils pour séparer les uns des autres des germes et pour « trier » en quelque sorte des espèces bactériennes contenues dans une même émulsion. Si, en effet, on transforme en aérosol une émulsion bactérienne, les microbes se trouvent entraînés mécaniquement avec les gouttelettes du brouillard, un seul germe se trouvant dans une seule gouttelette du fait de leurs dimensions respectives. Chaque gouttelette de brouillard projetée sur un milieu de culture favorable pourra donner naissance à une colonie isolée. Les expériences suivantes le prouvent.

a) *Appareillage et manipulation.* — Nous nous sommes servi dans nos essais d'un appareil producteur d'aérosols, simple, peu coûteux, facile à stériliser, auquel nous avons apporté quelques modifications destinées à assurer la sécurité de l'opérateur. Ces modifications consistent essentiellement en un entonnoir de matière stérilisable, relié par un tube de caoutchouc à l'orifice de sortie du brouillard. L'orifice de cet entonnoir a un diamètre légèrement supérieur à celui de la boîte de Petri sur laquelle on l'applique pour projeter l'aérosol : aucune des gouttelettes chargées de bactéries ne peut ainsi venir polluer l'air. L'alimentation en air de l'appareil se fait simplement à l'aide d'une poire en caoutchouc (1).

(1) L'appareil complet est fabriqué par la Maison Jouan, 113, boulevard Saint-Germain, Paris.



On place stérilement dans le fond de l'appareil, stérilisé lui-même, l'émulsion bactérienne avec laquelle on désire expérimenter. On envoie de l'air sous une pression de 500 g. environ (en opérant avec une poire, la comprimer trois ou quatre fois). L'air envoyé est filtré à travers un coton placé dans la tubulure d'introduction. L'aérosol, instantanément



FIG. 1. — « Séparateur de germes » stérilisé prêt à l'emploi. Par la tubulure munie d'un coton passera l'air comprimé formant l'aérosol. On introduira les cultures microbiennes par la tubulure munie d'un bouchon de liège.

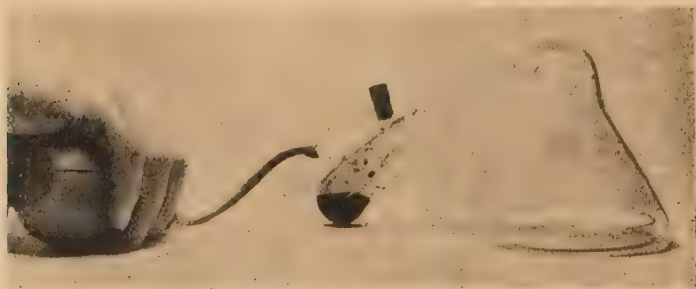


FIG. 2. — Emploi du « Séparateur de germes ». La boîte de Petri contenant le milieu est placée sous l'entonnoir. Le liquide est dans le fond de la colonne productrice d'aérosol. En comprimant la poire, l'opérateur va provoquer la formation de l'aérosol.

formé, est projeté sur un milieu de culture favorable. Deux ou trois secondes de fonctionnement suffisent pour obtenir un résultat.

b) *Examen de l'aérosol projeté sur une lame de verre.* — Afin de nous rendre compte si les aérosols assurent une bonne dispersion des germes, si ceux-ci sont parfaitement séparés les uns des autres à leur sortie de l'appareil, nous en avons projeté sur des lames de verre qui, colorées et examinées après fixation, ont montré en effet des éléments bactériens parfaitement isolés. Mais cette technique est difficile et d'observation délicate, du fait de la très grande dispersion des éléments.

c) *Colonies isolées obtenues à partir d'une émulsion d'une seule espèce bactérienne.* — Transformée en aérosol, une émulsion bactérienne donne des colonies parfaitement isolées, dont le nombre et l'espace-ment sont liés à différents facteurs sur lesquels nous reviendrons, et au temps de marche de l'appareil

d) *Colonies isolées obtenues à partir d'une émulsion de plusieurs espèces bactériennes.* — Nous avons mélangé dans une seule émulsion des germes différents (exemple : *E. coli*, Bacille pyocyanique, staphylocoque, *B. mesentericus*). Transformée en aérosol et projetée sur un milieu convenable, cette émulsion donne naissance à des colonies parfaitement isolées dont chacune correspond à une espèce bactérienne.

L'appareil utilisé mérite donc bien le nom de « Séparateur de germes » que nous lui avons donné et permet un isolement sûr, rapide et très simple de microbes à partir d'un mélange.

Le fonctionnement du « Séparateur de germes » étant basé sur le principe de l'inclusion d'une cellule bactérienne unique dans une seule gouttelette de l'aérosol, aucun résultat ne peut théoriquement être obtenu si les dimensions de la bactérie dépassent les dimensions de la gouttelette. C'est ce qui se passe en effet avec les levures, dont les émulsions, transformées en aérosols, ne donnent naissance à aucune colonie. Le phénomène inverse se produit si l'on opère avec un ultravirus, le bactériophage, par exemple. Le projetant sous forme d'aérosol à la surface d'une culture d'un microbe sensible, il est impossible d'obtenir les plages claires isolées ; on observe la formation de lyses très étendues qui prouvent que le bactériophage n'est pas passé à raison d'un seul élément par gouttelette d'aérosol.

Il est possible d'obtenir des résultats positifs dans l'un ou l'autre des cas précédents (éléments bactériens trop gros ou trop petits) en faisant varier les dimensions des gouttelettes d'aérosols.

e) *Influence des espèces bactériennes.* — Les émulsions de certaines espèces bactériennes, dont les dimensions n'excèdent pas les possibilités de l'appareil, ne donnent aucun résultat avec le séparateur de germes. Tels les bacilles tuberculeux : qu'il s'agisse de cultures en bouillon glycéroiné soigneusement broyées, de cultures en milieu de Dubos, aucune colonie n'apparaît sur le milieu à la surface duquel l'aérosol est projeté.

Cet échec est-il une confirmation du fait connu qu'il est extrêmement difficile d'obtenir une culture de bacille tuberculeux à partir d'une cellule unique ? D'autres facteurs interviennent-ils ? Nous ne le savons pas.

Les bacilles paratuberculeux passent ou ne passent pas, suivant l'espèce à laquelle on a affaire. Nous ignorons ici encore les raisons de ces échecs et de ces succès.

f) *Influence de la densité des émulsions.* — La totalité des germes contenus dans l'émulsion ne passe pas dans les gouttelettes de l'aérosol : une très faible partie seulement est projetée à l'extérieur. Les appareils dont nous nous sommes servis débitent environ 1/500 de centimètre cube par seconde sous une pression de 500 g.

Prenant une émulsion contenant 4 milliards de germes au centimètre cube, on devrait donc sortir théoriquement de l'appareil après trois secondes de marche environ 24 millions de germes. On obtient

en réalité 300 à 500 colonies, ce qui correspond à une émulsion contenant environ 80 à 100.000 germes au centimètre cube.

Il se fait, par ailleurs, une concentration considérable des germes dans l'émulsion. Un seul exemple : une émulsion contenant 4 milliards de germes par centimètre cube au début de l'expérience en contient 37 milliards après vingt minutes de marche.

Il en résulte qu'il ne faut pas opérer avec des émulsions ou avec des cultures peu riches : elles ne donnent pas de bons résultats.

★★

En résumé, le « Séparateur de germes », convenablement manié, permet d'obtenir, à partir de cultures ou d'émulsions contenant un ou plusieurs microbes différents, des colonies parfaitement isolées, nées de cellules uniques. Cette technique nouvelle peut, semble-t-il, dans bien des cas, remplacer du fait de sa simplicité de manœuvre et de la rapidité de son fonctionnement, les micromanipulateurs.

Le « Séparateur de germes » permet, dans la pratique courante, de purifier les cultures polluées, de trier différentes variétés de colonies dans une culture pure, de séparer les mutants, etc. Il possède enfin des applications dans l'analyse bactériologique des produits pathologiques, dont nous parlerons dans une prochaine note.

(Institut d'Hygiène, Lausanne.)

## ESSAI DE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE PAR LES FORMES HYPERACTIVES DU P. A. S. (PARA-AMINOSALICYLATE DE SODIUM)

par J. SOLOMIDÈS et E. BOURLAND.

Nous avons montré précédemment (1) que le P. A. S. en solutions aqueuses concentrées (1/3, 1/5 ou même 1/10), titré en milieu de Sauton additionné de sérum suivant la technique indiquée par l'un de nous (2), était doué d'un pouvoir tuberculostatique trois cents fois supérieur à celui du P. A. S. en solutions aqueuses diluées titré dans les mêmes conditions. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier, *in vivo*, chez le cobaye tuberculeux, l'activité chimiothérapique des formes hyperactives du P. A. S. (solutions concentrées de cette substance).

Dans une première série d'expériences, 20 cobayes ont été tuberculisés par voie sous-cutanée, avec 0,001 mg. d'une souche humaine

(1) J. SOLOMIDÈS et E. BOURLAND, ces *Annales*, 1949, **76**, 245 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1949, 143, 181.

(2) J. SOLOMIDÈS, ces *Annales*, 1949, **76**, 371.

(Knack...) de bacille tuberculeux extrêmement virulent, puis immédiatement après, 10 d'entre eux reçoivent, tous les jours, dimanches exceptés, une injection sous-cutanée de 0,10 g. de P. A. S. en solution concentrée à 1/5. Les trentième, trente-cinquième et quarantième jours 3 cobayes témoins et 3 cobayes traités ont été sacrifiés et autopsiés. Nous avons ainsi constaté que les cobayes témoins étaient porteurs, dès le trentième jour, de lésions tuberculeuses sévères siégeant sur la rate qui est granuleuse et hypertrophiée et même nécrotique vers le quarantième jour, sur le foie qui est extrêmement touché et sur les poumons sous forme de petites granulations grises, assez rares vers le trentième jour, mais beaucoup plus nombreuses et confluentes vers le quarantième jour. D'une façon générale, les animaux traités, sacrifiés, soit le trentième, soit le trente-cinquième, soit le quarantième jour, ne présentaient pas de lésions macroscopiques viscérales appréciables. La rate était, en général, lisse, peu ou pas hypertrophiée. Chez deux animaux, la rate portait une ou deux petites lésions. Le foie était généralement intact, à l'exception de quelques petites lésions insignifiantes chez un ou deux animaux. Les poumons, à l'exception d'un seul animal sacrifié le quarantième jour, ne portaient aucune lésion macroscopiquement décelable. Par contre, chez tous les animaux traités et non traités les ganglions inguinaux, lombaire et sous-hépatique étaient constamment atteints, sans exception aucune; seuls les ganglions trachéobronchiques n'étaient pas atteints chez les animaux traités. Nous n'avons pu observer de bacilles tuberculeux dans les frottis de la rate des cobayes traités, malgré une recherche prolongée de ces germes (jusqu'à trente minutes au microscope). Cependant, l'ensemencement de la rate de 5 cobayes traités sur 4 milieux de Löwenstein a été positif quatre fois sur cinq. Il est à noter aussi que l'intradermo-réaction tuberculinique, pratiquée vers le vingt-sixième jour, a été négative ou très faiblement positive chez les animaux traités, alors qu'elle a été, en général, positive chez les animaux témoins.

A la suite de ces expériences préliminaires, nous avons tuberculisé 60 cobayes avec 0,001 mg. de la même souche tuberculeuse qui a servi dans les expériences précédentes, puis vingt-quatre heures après un lot de 18 cobayes et deux lots de 8 cobayes ont été traités respectivement avec 0,10 g., 0,05 g. et 0,03 g. de P. A. S. en solution concentrée à 1/5, administré par voie sous-cutanée en une seule injection quotidienne (sauf les dimanches). En outre, un lot de 8 cobayes reçoit, dans les mêmes conditions, 0,03 g. de P. A. S. en solution aqueuse diluée à 1/100 et un lot de 18 cobayes ne reçoit rien et sert de témoin. Les dix-huitième et vingt-quatrième jours deux ou trois animaux de chaque lot ont été sacrifiés, puis autopsiés. On constate, dans ces conditions, que les animaux des trois premiers lots (traités avec du P. A. S. en solution concentrée à 1/5) ne présentent aucune lésion viscérale ou splénique (la rate est petite et lisse), alors que les animaux témoins ou traités avec la solution diluée de P. A. S. (à 1/100) présentent des lésions très nettes sur la rate qui est nettement tuberculeuse et hypertrophiée, et parfois même quelques petites lésions sur le foie. Le trentième jour, tous les animaux épargnés, traités et non traités, sont, à leur tour, sacrifiés, puis autopsiés. On constate ainsi que tous les animaux témoins ou traités avec la solution à 1/100 de P. A. S. présentent des lésions tuberculeuses sévères sur la rate et le foie, et



des granulations plus ou moins nombreuses sur les poumons ; chez les animaux traités avec 0,05 g. ou 0,03 g. de P. A. S. à 1/5 les lésions sur la rate et le foie sont beaucoup moins prononcées et à peu près absentes sur les poumons ; seuls les animaux traités avec 0,10 g. de P. A. S. en solution concentrée (à 1/5) présentent à peu près le même tableau que celui trouvé dans l'expérience précédente : rate lisse ou très légèrement granuleuse, peu ou pas hypertrophiée ; foie et poumons à peu près intacts. Les organes (rate, foie et poumon) d'un certain nombre d'animaux traités et non traités ont été examinés au point de vue anatomo-pathologique. D'une façon générale, on peut dire que les viscères des animaux traités ne présentent que de rares nodules réactionnels et les bacilles tuberculeux y sont inexistantes ou, en tout cas, extrêmement rares. Par contre, les organes des animaux témoins sont bourrés de nodules, très souvent confluents et caséifiés et contiennent de nombreux bacilles tuberculeux (3).

DISCUSSION. — Nous avons déjà montré précédemment (1) que les formes hyperactives et hydrolabiles du P. A. S. diluées dans le sérum de cheval gardaient, *in vitro*, leur pouvoir tuberculostatique intact. Il était donc vraisemblable que ces formes hyperactives du P. A. S., telles qu'elles existent dans ses solutions concentrées, introduites par voie parentérale dans l'organisme animal, ne perdraient pas leur grande activité antituberculeuse. Les expériences que nous rapportons montrent clairement que les solutions concentrées du P. A. S. sont fortement actives *in vivo* dans la tuberculose expérimentale aiguë du cobaye. Leur effet chimiothérapique peut être mis en évidence très rapidement dans l'espace de quelques semaines (trois ou quatre) en employant des doses relativement faibles (0,03 g. à 0,10 g. par jour). Il est à noter que dans nos propres expériences la dose quotidienne de 0,03 g. en solution à 1/100 n'a produit aucun effet chimiothérapique appréciable et que dans les expériences de Swedberg et Windström une dose quotidienne de 0,04 g. de P. A. S. administrée en deux injections sous-cutanées ne s'est pas montrée plus active [malheureusement la concentration de la solution employée n'est pas indiquée] (4). En réalité, pour obtenir un effet chimiothérapique sur la tuberculose expérimentale du cobaye avec le P. A. S. ordinaire (ses formes hydrolabiles), il semble nécessaire d'avoir recours à des doses de P. A. S. considérables qu'on ne peut alors administrer que par voie buccale ; c'est ce qui ressort des expériences de Feldman, Karlson et Hinshaw qui n'ont pu mettre en évidence l'influence favorable du P. A. S. ordinaire sur le cobaye tuberculeux qu'après un traitement prolongé (cent dix-neuf jours) et en administrant 1,60 g. de cette substance par jour et par voie buccale (5).

Notons aussi la rapidité avec laquelle l'effet chimiothérapique du P. A. S. hyperactif peut être mis en évidence sur le cobaye tuberculeux

(3) Nous adressons nos vifs remerciements à M. Bablet, Chef de Service à l'Institut Pasteur, pour l'aide très précieuse qu'il nous a apportée dans l'interprétation des coupes des organes.

(4) SWEDBERG et WINDSTRÖM, *Acta med. Scand.*, 1948, **131**, 116.

(5) FELDMAN, KARLSON et HINSHAW, *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic*, 1947, **22**, 473.

(en trois à quatre semaines) ; à ce propos, il nous semble intéressant de rappeler que, d'après certains travaux américains, l'effet chimiothérapique de la streptomycine sur les lésions tuberculeuses du cobaye ne peut être mis en évidence qu'après un traitement de huit à dix semaines (6) et que la streptomycine n'empêche pas, chez le cobaye, la dissémination du bacille tuberculeux et la constitution de lésions tuberculeuses, mais que ces lésions diminuent progressivement après un traitement prolongé de cent vingt-huit jours (7).

**RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.** — Des cobayes traités, immédiatement après tuberculisation par des doses relativement faibles de P. A. S. hyperactif (solution aqueuse concentrée) variant de 0,03 à 0,10 g. par jour, montrent après trois ou quatre semaines de traitement des lésions viscérales insignifiantes et très peu prononcées par rapport à celles des cobayes témoins ; les délais relativement brefs nécessaires pour obtenir ces résultats semblent constituer un progrès appréciable dans la chimiothérapie de la tuberculose expérimentale aiguë du cobaye.

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose et Laboratoire de Chimie microbienne.)

## PERFECTIONNEMENTS AUX PROCÉDÉS USUELS DE CULTURE DU BACILLE DE KOCH A PARTIR DES PRODUITS SURINFECTÉS

par FERNAND TISON

La pratique de plus de 3.500 cultures au Laboratoire Central a permis l'étude de quelques perfectionnements portant sur des points de détail, mais améliorant considérablement le rendement.

La grosse majorité des examens est faite à partir de crachats recueillis directement ou par tubage.

Les précautions à prendre pour la collecte des produits pathologiques et leur expédition au laboratoire ont été décrites par ailleurs (1).

Nous allons exposer en détail la méthode utilisée actuellement.

1° *Broyer 2 cm<sup>3</sup> de crachat* (ou du produit pathologique surinfecté) dans un mortier avec 3 cm<sup>3</sup> de soude à 4 p. 100 mesurés à la pipette. L'action de la soude a été choisie de préférence à celle de l'acide sulfurique pour des raisons longuement exposées (2). Le mélange est aussitôt versé dans un tube à centrifuger stérile couvert de 100 cm<sup>3</sup>, ce qui a pour but d'éviter la chute de poussières dans un mortier largement ouvert et surtout le ramassage par la suite de parcelles infectées et non touchées par la soude sur les parois du mortier.

(6) SMITH, EMMART et MC CLOSKEY, *Amer. Rev. Tuberc.*, 1948, 58, 112.

(7) STEENKEN, *Amer. Rev. Tuberc.*, 1947, 56, 382.

(1) TISON, ces *Annales*, 1947, 73, 684.

(2) TISON, ces *Annales*, 1947, 73, 186.

Le tube couvert est porté à l'étuve à 37°, une demi-heure.

2° *Ajouter alors environ 70 cm<sup>3</sup> de solution d'acide sulfurique contenant 3,5 cm<sup>3</sup> d'acide p. 1.000.* La neutralisation approximative est ainsi obtenue. Eviter l'addition d'un réactif coloré et la neutralisation par tâtonnement qui donnent des risques nouveaux de souillure, un échauffement parfois exagéré et une dilution accrue et mal calculée.

3° *Centrifuger une demi-heure à 3.000 tours-minute.* Une telle centrifugation n'a pas d'action néfaste sur le bacille de Koch (3).

Le culot obtenu est bien égoutté. Son petit volume rend sans importance le léger écart possible du pH. L'élimination du liquide entraîne presque tout le sulfate de soude résultant de la neutralisation et dont la présence serait défavorable à la culture (4).

4° *Diluer le culot dans de l'eau glycinée stérile à 2 p. 100 (3 cm<sup>3</sup> environ pour 6 tubes).* On obtient ainsi une solution homogène où les bacilles (s'ils sont présents) sont uniformément répartis dans un petit volume.

Ce dernier point a une grosse importance pour la mesure rapide de la sensibilité aux antibiotiques, selon les méthodes préconisées par Et. Bernard et Kreis (5) et Bretey, Coletsos et Boisvert (6).

La présence de glycérine favorise la bonne tenue de l'émulsion et surtout le départ rapide des colonies sur milieux solides.

Cette méthode appliquée plusieurs centaines de fois en parallèle avec les méthodes classiques nous a montré :

Une sensibilité plus grande,

Une meilleure répartition des colonies,

Une rareté extrême des tubes souillés.

5° *Choix du milieu de culture.* L'ensemencement de la moitié du culot de centrifugation sur un nombre égal de tubes de deux milieux différents nous a permis des comparaisons portant sur des centaines de tubes. A la suite de multiples essais, nous nous sommes arrêté actuellement au milieu de Löwenstein modifié par Jensen qui nous paraît le plus sensible et le plus fidèle.

(Sanatorium de Praz-Coutant, Haute-Savoie.)

## ISOLEMENT DE LA PREMIÈRE SOUCHE HUMAINE AUTOCHTONE DE *PASTEURILLA TULARENSIS*

par G. GIRARD, P. CORDIER et P. GARNIER.

Les cas de tularémie humaine sur notre territoire n'avaient jusqu'à présent été identifiés que par l'épreuve du séro-diagnostic. On admet que l'agent étiologique n'a de chance d'être isolé du sang, de la salive

(3) TISON, ces *Annales*, 1948, **74**, 128.

(4) TISON, *Sem. Hôp. Paris*, 1949, **9**, 389.

(5) Et. BERNARD et B. KREIS, *Rev. Tub.*, 1949, **43**, 124.

(6) BRETEY, COLETSOS et BOISVERT, ces *Annales*, 1949, **76**, 188.

ou des ganglions qu'à la phase initiale de la maladie, mais ce délai n'est pas précisé. D'autre part, l'ensemencement direct du matériel suspect ne réussit qu'exceptionnellement et le passage préalable par cobaye ou souris est pour certains auteurs considéré comme indispensable ; la septicémie massive à laquelle succombent ces rongeurs permet aisément la culture du micro-organisme spécifique qui pullule dans le sang et les viscères.

L'un de nous, au cours des années 1947 et 1948 a inoculé dans le péritoine de souris du pus d'adénites tularémiques reçu de 5 malades à séro-diagnostic positif et dont la maladie remontait à quatre, six et huit semaines. Les animaux restèrent indemnes ; sacrifiés après quinze jours, de nouveaux passages faits avec le broyat de leur rate ne permirent pas de mettre en évidence *Pasteurella tularensis*. La première inoculation positive appartient au Professeur V. de Lavergne qui, en 1947, à Nancy, opéra sur des cobayes avec du matériel prélevé au sixième jour d'une tularémie apparue chez deux personnes contaminées à la même source : un broyat de ganglion chez un des malades, un prélèvement de gorge chez le second porteur d'une angine tuèrent les cobayes en dix et onze jours et l'autopsie révéla les signes habituels de la tularémie expérimentale ; mais faute de milieu approprié, la souche ne fut pas isolée (1).

Dans les premiers jours d'avril 1949, à l'hôpital de Saint-Denis, le Dr Delafontaine porte le diagnostic de tularémie chez une fillette de douze ans, diagnostic confirmé par un séro-diagnostic positif à 1 p. 100. La contamination se situe le 19 mars et les premiers symptômes apparaissent le 22, mais ce n'est que le dixième jour que la malade est hospitalisée et un traitement à la streptomycine est de suite institué à la dose de 1 g. *pro die*. Après quatre jours de traitement, un cobaye est inoculé sous la peau de la cuisse avec la sérosité d'une adénite axillaire, et le lendemain, soit après 5 g. de streptomycine, l'opération est répétée sous la peau de 2 souris. Ces épreuves ont été effectuées les 4 et 5 avril. Le cobaye meurt le 17, les souris, une le 18, l'autre le 20. Les lésions sont caractéristiques et sur le milieu de Francis (avec la bacto-peptone Difco) une culture pure de *Pasteurella tularensis* est obtenue d'emblée du sang du cœur des souris. Simultanément, un passage avait été fait sous la peau de 2 souris neuves avec un peu de pulpe splénique, et ces 2 souris succombaient en vingt-quatre heures de septicémie tularémique.

Il a donc été possible, au quinzième jour d'une tularémie ganglionnaire, de mettre en évidence par culture l'agent étiologique dans la sérosité ganglionnaire. Mais l'évolution a été d'une longueur inhabituelle chez les animaux inoculés, puisqu'elle a atteint treize jours pour le cobaye, treize et quinze jours pour les souris. Cette anomalie est vraisemblablement attribuable à la streptomycine. On peut même se montrer surpris d'avoir réussi à isoler une souche de *P. tularensis* dans de telles conditions, alors que la streptomycine est considérée comme la médication spécifique de la maladie. Toutefois, par passage sur la souris, le micro-organisme reprit une virulence extrême, du même ordre que celle de la souche isolée par R. Paille au cours d'une

(1) Renseignements aimablement communiqués par le Prof. DE LAVERGNE et rapportés ici avec son autorisation.



épizootie chez des lièvres dans le Doubs en 1947, et qui tue la souris à l'unité, d'après nos constatations, après un délai qui n'excède pas huit jours, des doses plus élevées provoquant la mort entre deux et six jours (2).

En vérité, l'ensemencement *direct* du matériel suspect permettra seul d'étudier le pouvoir pathogène des souches humaines et de le confronter avec celui des souches de provenance animale. Le passage préalable par rongeur est susceptible de modifier profondément leurs propriétés. Il n'est pas impossible, quoi qu'on en ait dit ou écrit, d'obtenir des cultures du sang ou des adénites à la phase de début de la tularémie si l'on emploie le milieu classique de Francis, avec de la *bacto-peptone*, et il existe des observations américaines attestant que cet isolement *direct* a été réalisé.

En résumé, nous rapportons la première observation de tularémie humaine identifiée en France par l'isolement de l'agent étiologique, *Pasteurella tularensis*, au quinzième jour de la maladie, et malgré un traitement par la streptomycine.

[Institut Pasteur (Service de la Peste)  
et Laboratoire de l'Hôpital de Saint-Denis.]

## EXTRACTION DES TOXINES BOTULINIQUES A PARTIR DES CORPS MICROBIENS

par M. RAYNAUD et L. SECOND (\*).

L'un d'entre nous a montré (1, 2) que l'on peut extraire la toxine de *Plectridium tetani* et celle de *Clostridium sordellii* des corps bactériens lavés des germes correspondants. A.-R. Prévot a obtenu des résultats analogues dans le cas de *Clostridium botulinum* type D. Nous rapportons ici les résultats d'expériences établissant qu'il est possible d'extraire les toxines de *Clostridium botulinum* A et B, à partir des corps microbiens lavés et confirmant ainsi les observations anciennes de Nelson (3).

**TECHNIQUES.** — Les cultures ont été faites dans un milieu constitué par un mélange de digestion papainique et de digestion pepsique de viande et de foie, additionné de 12 p. 1.000 de glucose. Le bouillon est réparti en Erlenmeyers de 1 litre, auxquels on ajoute 5 g. de poudre de globules rouges desséchés. Le pH est ajusté à 6,5. La stérilisation s'effectue par chauffage à 115° pendant trente minutes. On ensemence

(2) R. PAILLE, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 9.

(\*) Nous sommes heureux de remercier M. Legroux qui nous a fourni la possibilité d'effectuer ces expériences.

(1) M. RAYNAUD, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.

(2) M. RAYNAUD, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 98.

(3) NELSON, *J. inf. Dis.*, 1927, **41**, 302.

avec une suspension de spores chauffées de la souche correspondante. La dose minima mortelle est déterminée par inoculation au cobaye de 250 g. (dose limite provoquant la mort en quatre jours). Dans le milieu utilisé, les souches que nous avons employées donnent les taux suivants de toxine, après culture à 37° pendant les durées indiquées au tableau I :

TABLEAU I.

	24 HEURES	5 JOURS	8 JOURS
<i>Cl. botulinum</i> A . . . . .	1/500	1/10.000	1/10.000
<i>Cl. botulinum</i> B . . . . .	1/100.000	1/500.000	1/500.000

La D. M. M. est exprimée en centimètres cubes de filtrat.

On constate que le taux maximum de toxine est atteint dès le cinquième jour.

1° EXTRACTION DE LA TOXINE A PARTIR DES CORPS BACTÉRIENS LAVÉS OBTENUS APRÈS VINGT-QUATRE HEURES DE CULTURE A 37°. — Les germes sont prélevés vingt-quatre heures après le début apparent de la culture, début manifesté par le dégagement de gaz. Dans les conditions employées (ensemencement avec une suspension de spores), ce dégagement de gaz n'apparaît qu'après douze heures de latence. Les corps microbiens sont recueillis par centrifugation et lavés trois fois avec un volume d'eau distillée égal au volume de bouillon centrifugé. On prélève une partie de ces eaux de lavage (qui seront désignées dans les tableaux par L 1, L 2, L 3), on les filtre et on détermine la quantité de toxine qu'elles

TABLEAU II.

	D. M. M.	VOLUME TOTAL	NOMBRE TOTAL de D. M. M.
<i>Cl. botulinum</i> A :			
Bouillon . . . . .	1/500	1.000	5.10 <sup>5</sup>
L1 . . . . .	1/100	1.000	10 <sup>5</sup>
L2 . . . . .	1/100	1.000	10 <sup>5</sup>
L3 . . . . .	1/10	1.000	10 <sup>4</sup>
L4 . . . . .	1/100	100	10 <sup>4</sup>
Extrait eau distillée . . . . .	1/100	100	10 <sup>4</sup>
Extrait NaC <sub>4</sub> M <sub>4</sub> citrate M/10 .	1/2.000	100	2.10 <sup>5</sup>
<i>Cl. botulinum</i> B :			
Bouillon . . . . .	1/100.000	1.000	10 <sup>6</sup>
L1 . . . . .	1/1.000	1.000	10 <sup>6</sup>
L2 . . . . .	1/500	1.000	5.10 <sup>5</sup>
L3 . . . . .	1/500	1.000	5.10 <sup>5</sup>
L4 . . . . .	1/1.000	100	10 <sup>5</sup>
Extrait eau distillée . . . . .	1/5.000	100	3.10 <sup>5</sup>
Extrait NaCl M/1 citrate M/10.	1/100.000	100	10 <sup>7</sup>
Les volumes sont exprimés en centimètres cubes.			

contiennent par inoculation au cobaye. On lave une quatrième fois dans un volume d'eau distillée égal au 1/10 du volume de bouillon initial. La suspension de corps bactériens obtenue en reprenant le culot de germes provenant du troisième lavage dans ce volume restreint d'eau distillée est éventuellement répartie en plusieurs fractions pour obtenir des lots égaux de corps bactériens semblables. Ces culots sont remis en suspension dans un volume de solution saline égal au 1/10 du volume de bouillon initial. On laisse à 0° pendant vingt-quatre heures. Au bout de cet intervalle de temps, on centrifuge et le liquide surnageant est filtré sur bougie stérilisante. On détermine la D. M. M. du filtrat ainsi préparé.

Nous avons recherché le pouvoir d'extraction des liquides suivants :

1° L'eau distillée additionnée d'une très faible quantité (0,001 M) d'acétate de sodium et ajustée à pH 6,3.

2° La solution : NaCl M/1 + citrate de sodium M/10 ajustée à pH 6,3.

On peut constater que l'eau distillée (ou plus exactement la solution très diluée d'acétate de sodium) n'extraît que de faibles quantités de toxine, alors que la solution concentrée de NaCl et citrate de sodium enlève des quantités notables de toxine.

Nous n'avons pas recherché systématiquement le pouvoir extracteur d'autres solutions. Il est fort possible que l'on puisse en trouver qui soient plus efficaces que celle que nous avons employée. Remarquons à ce sujet que lorsque les lavages des corps bactériens sont effectués avec de l'eau physiologique, les résultats sont moins nets, comme l'avait déjà noté Nelson (3), car à chaque lavage, on entraîne plus de toxine que lorsqu'on emploie l'eau distillée. Le point important que nous avons établi est le suivant : les lavages des corps bactériens à l'eau distillée sont certainement suffisants pour éliminer de ces derniers les traces de bouillon qu'ils peuvent avoir retenues. La toxine trouvée dans les extraits par la solution de NaCl M/1 citrate M/10 provient bien des corps bactériens. Elle représente au bout de vingt-quatre heures de culture à 37° une fraction importante de la toxine totale (toxine du bouillon + toxine des eaux de lavage + toxine des extraits). Cette fraction est de 22 p. 100 dans le cas de *Cl. botulinum* A et de 9 p. 100 environ dans le cas de *Cl. botulinum* B.

2° INFLUENCE DE LA DURÉE DE CULTURE SUR LA QUANTITÉ DE TOXINE EXTRAITE PAR LES SOLUTIONS SALINES CONCENTRÉES. — Les corps bactériens sont recueillis après des durées variables de culture à 37° et traités comme il a été indiqué précédemment (4 lavages à l'eau distillée ; extraction par un volume de solution de NaCl M/1 citrate M/10 égal au 1/10 du volume de bouillon initial). Nous donnons dans les tableaux ci-dessous la valeur de la D.M.M. des extraits et la quantité totale de toxine ainsi obtenue.

Au bout de huit jours de culture à 37°, les corps bactériens ne contiennent pratiquement que des quantités négligeables de toxine, tandis que le taux dans le bouillon a augmenté. Il est bien évident que ces données n'ont qu'une valeur indicative, car il n'est pas sûr du tout que la technique d'extraction que nous avons employée permette d'obtenir toute la toxine présente dans les corps bactériens.

Les toxines botuliniques pouvant dans certaines conditions résister à l'action de l'acidification et à celle de la pepsine, nous avons recherché

DURÉE DE CULTURE	D. M. M.		QUANTITÉ TOTALE DE TOXINE (nombre de D. M. M.)	
	Bouillon	Extrait	Bouillon	Extrait
<i>Cl. botulinum</i> A :				
24 heures . . . . .	1/500	1/2.000	$5.10^8$	$2.10^8$
8 jours . . . . .	1/10.000	1/40	$10^7$	$10^8$
<i>Cl. botulinum</i> B :				
24 heures . . . . .	1/100.000	1/100.000	$10^8$	$10^7$
8 jours . . . . .	1/500.000	1/100	$5.10^8$	$10^4$

s'il ne serait pas possible d'obtenir une meilleure extraction en traitant les corps microbiens par la pepsine à pH = 3, en tampon acétate 0,140 M. Nous n'avons pu, dans ces conditions, obtenir aucune quantité décelable de toxine botulinique à partir des suspensions bactériennes.

L'impossibilité d'extraire les toxines botuliniques à un taux élevé par l'eau distillée pourrait n'être qu'apparente, la toxine étant bien extraite, mais se dénaturant par séjour à 0° dans un milieu de faible force ionique. Nous avons recherché si une toxine botulinique B placée dans les mêmes conditions perdait son activité. Pour cela nous avons mis en contact une dilution de toxine B et une suspension bactérienne de germes de *Cl. botulinum* B recueillis après vingt-quatre heures de culture et nous l'avons placée à 0° pendant vingt-quatre heures. Nous n'avons pas observé de baisse appréciable de toxicité. Mais il s'agissait d'une toxine stabilisée, c'est-à-dire d'une toxine qui avait séjourné à 0° assez longtemps pour que son titre ne varie plus. La faible valeur du taux de toxine obtenu par action de l'eau distillée sur les suspensions bactériennes est donc peut-être due à des phénomènes complexes. Il n'en reste pas moins qu'il est possible d'extraire des quantités appréciables de toxine des corps microbiens. Le taux de toxine extraite varie avec l'âge de la culture. Il est relativement élevé pour les germes jeunes et faible pour les germes âgés. Les toxines botuliniques semblent donc être des constituants de la cellule bactérienne qui diffusent progressivement dans le milieu extérieur. Elles se rapprochent à ce point de vue des toxines de *Pl. tetani* et de *Cl. sordellii*. Il existe ainsi tout un groupe d'exotoxines qui paraissent être d'abord en concentration appréciable dans le corps microbien. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un phénomène analogue dans le cas de *Welchia perfringens* type A et de divers autres microbes anaérobies. Il sera intéressant de voir si la distinction que l'on peut ainsi établir parmi les exotoxines présente une signification générale.

(Institut Pasteur.)



## MODES D'EXAMEN DU LYMPHOCYTE *IN VITRO* : CONTRASTE DE PHASE

par J. LEBRUN et P. MANIGAULT.

L'un de nous vient de montrer (1) l'intérêt des colorations vitales et de l'observation des pycnoses pour l'étude des lymphocytes. Nous avons pensé que l'examen microscopique par contraste de phase permet de voir directement, sur le vivant, sans coloration, des structures qui correspondent à de faibles différences d'indices ou d'épaisseur, et de suivre leurs modifications au cours de phénomènes de transition : ceux qui précèdent la mort cellulaire, par exemple. Il est alors commode de disposer d'un montage qui permette la photographie en même temps que l'observation, et l'appareil de Koristka qui nous a été confié pour cette étude répond bien à toutes ces exigences.

Cette méthode nouvelle a été adoptée en cytologie par divers auteurs (2, 3, 4, 5), et elle a retenu l'attention de tous les biologistes. Il est à noter que les préparations doivent être minces et faites sur des lames très propres. Nous avons examiné à l'état frais des lymphocytes de ganglions de cobayes étalés à l'aide d'une goutte de plasma, comme l'a décrit M<sup>me</sup> Lebrun (6). Pour éviter toute altération des cellules, celles-ci ne subissent pas de compression, aussi la préparation ne peut-elle être qu'assez épaisse et la photographie prend un aspect de « fond noir ». Sur des préparations plus minces le contraste eût été encore plus grand et le fond cependant beaucoup plus clair, mais en aucune façon on ne saurait confondre l'image observée en contraste de phase avec celle que l'on obtient par l'emploi d'un condensateur à fond noir.

Les cellules photographiées au début de l'expérience paraissent assez homogènes (fig 1 et 2). Puis (fig. 3), on assiste à une condensation du noyau, qui s'accuse (fig. 4), alors que le protoplasma se gonfle (potocytose) et laisse voir des vacuoles brillantes. La cellule tuée par la quinine à 1/1.000 présente un aspect assez analogue (fig. 5). Nous avons l'intention d'apporter une interprétation précise de ces images dans un travail ultérieur.

La figure 6 montre l'aspect au microscope ordinaire d'un lymphocyte normal (à droite) et d'un lymphocyte à noyau plus petit, entouré d'un cytoplasme volumineux dont les contours sont peu visibles (à gauche). La photographie a été faite avec un diaphragme presque complètement

(1) J. LEBRUN, ces *Annales*, 1949 (sous presse).

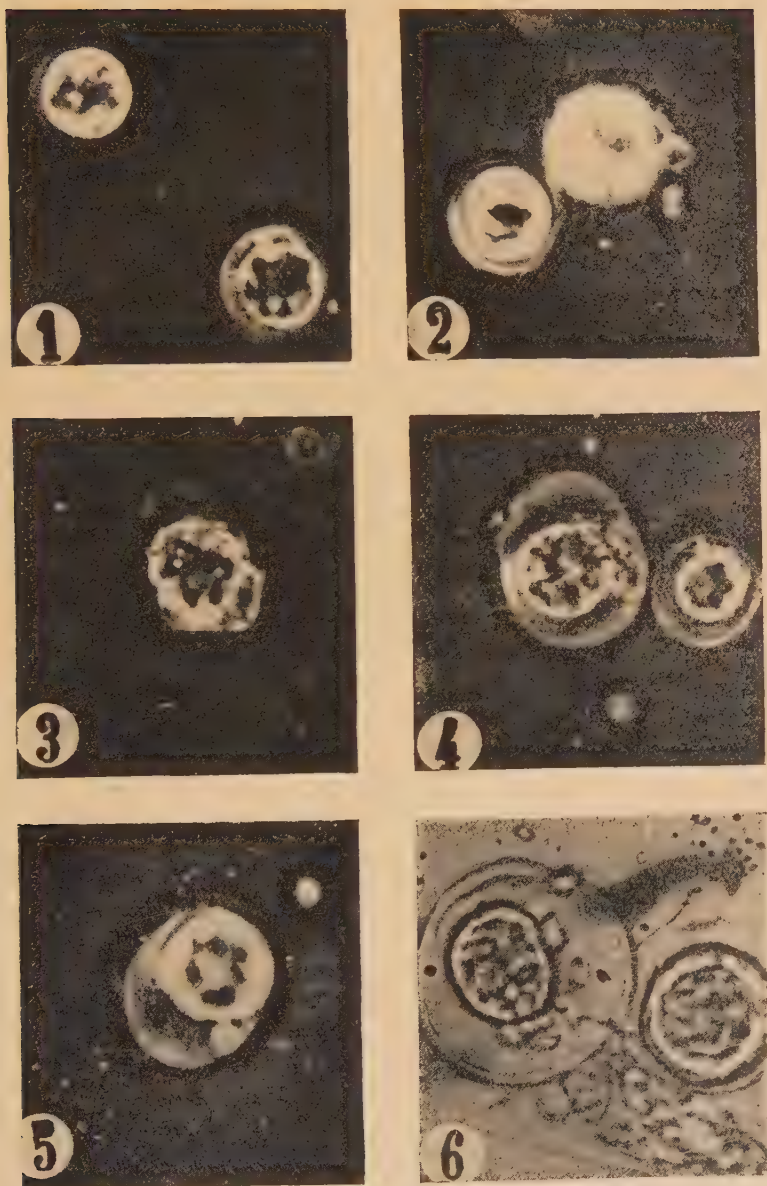
(2) BESSIS, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **140**, 1497 ; *Rev. Hématol.*, 1949, **4**, 95.

(3) A. T. BRICE, R. P. JONES, J. D. SMYTH, *Nature*, 1946, **157**, 553.

(4) A. CORTI, *Atti Accad. nazion. Lincei*, 1948, **4**, 132.

(5) H. U. ZOLLINGER, *Amer. J. Pathol.*, 1948, **24**, 545 et 569.

(6) J. LEBRUN, ces *Annales*, 1949 (sous presse).



Lymphocytes observés en contraste de phase (1, 2, 3, 4, 5)  
et au microscope ordinaire (6). 950  $\times$ .

fermé pour augmenter le contraste. En la comparant aux précédentes on peut, dès à présent, apprécier l'intérêt du contraste de phase en cytologie.

(Institut Pasteur.)

## NOTE SUR UN PROCÉDÉ SIMPLIFIÉ DE FILTRATION DES CORPUSCULES RICKETTSOIDES DU TRACHOME

par L. POLEFF

Le pouvoir filtrant des corpuscules rickettsioides du trachome (c. élémentaires), dont la culture (Poleff, Macchiavello) peut être considérée à l'heure actuelle hors de conteste, a été établi définitivement dans une expérience de Thygeson et Richards (1) avec les produits de raclage des granulations conjonctivales recueillis dans 10 cas choisis du trachome évolutif. Le filtrat obtenu à travers une membrane de collodion ayant des pores de 0,6 micron de diamètre et centrifugé à grande vitesse a révélé la présence de corpuscules élémentaires typiques, dont la virulence fut prouvée sur l'homme.

Faute de membranes filtrantes que nous n'avons pu nous procurer à cette époque d'après guerre, nous nous sommes adressé à l'ancienne, quoique bien imparfaite, méthode de filtration sur bougies. Nous nous sommes proposé d'élaborer une technique simple permettant de filtrer les petites quantités de matériel provenant d'un seul malade ou d'une culture, etc. Dans ce but nous nous sommes servi de petites bougies dont l'emploi nous a été très aimablement conseillé par notre excellent collègue et ami, le Dr Bailly, de l'Institut Pasteur de Tanger (2).

En voici la TECHNIQUE. Sur une bougie Chamberland L 3 ou Berkefeld N est adapté au moyen de plâtre un tube de verre de 25 à 30 cm. environ de longueur. L'ensemble est introduit dans une petite fiole ou directement dans un tube à centrifuger et y est maintenu par un bouchon de coton bien serré. L'ouverture supérieure du tube est fermée par un capuchon de verre, lui-même protégé par du papier. La stérilisation se fait à sec, après quoi le dispositif est prêt pour la filtration (fig. 1).

POUR PRÉPARER une émulsion tissulaire renfermant les corpuscules virulents à l'état de suspension et aptes à traverser le filtre, le matériel subit un broyage très minutieux avec du verre pilé, afin de faire éclater les cellules et mettre en liberté les corpuscules, étant donné que ces derniers, comme on le sait, se trouvent de préférence à l'intérieur des cellules. La suspension sera effectuée par addition successive au broyat d'une quantité connue (10 cm<sup>3</sup> environ pour 1 g. de tissu) de bouillon stérile. L'émulsion ainsi obtenue passe tout d'abord sur un papier

(1) THYGESON et RICHARDS, *Arch. Ophth.*, 1938, 20, 569.

(2) Bougie Chamberland petit modèle à embase vernie 5 cm. 5 de longueur. On peut se les procurer chez Jouan, boulevard Saint-Germain, 113, Paris-6e.

filtre rincé au préalable avec du bouillon. Le liquide dépourvu de substance tissulaire sera introduit par la suite, au moyen d'une pipette Pasteur, dans le tube monté sur la bougie. La filtration se produit assez rapidement sous l'effet de la pression qu'exerce le liquide lui-même ; la filtration pourra être accélérée par l'addition d'une portion supplémentaire de bouillon.

Les AVANTAGES du procédé exposé ci-dessus sont évidents : simplicité du dispositif et des manipulations, validité pour des quantités minimes

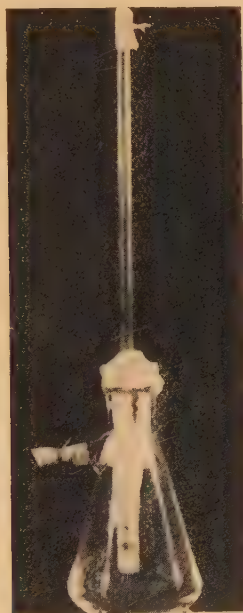


FIG. 1.

de matériel à examiner, facilité de compléter cet examen par une centrifugation rapide, etc.

Par contre, quelques inconvénients d'ordre pratique propres à cette méthode de filtration en général, tels que la fragilité des bougies, le colmatage facile des pores, etc., sont équilibrés par le prix relativement bas des bougies permettant leur renouvellement assez fréquent.

Suivant la composition du matériel à filtrer une même bougie peut servir à 3 ou 5 opérations environ.

Le nettoyage des bougies après usage s'effectue de la façon suivante, d'après Bailly :

On les plonge pendant plusieurs heures d'abord dans une solution de permanganate de potassium à 1 p. 1.000, ensuite dans un bain de sulfate de sodium à 2 p. 100. On rince à l'eau distillée et on sèche.



Witlin (3) conseille après le lavage de plonger les bougies colmatées dans une solution de pepsine à 0,3 avec 1 p. 100 d'acide chlorhydrique.

**RÉSULTATS.** — Avec la technique ci-dessus exposée nous avons procédé à 6 expériences de filtration. Le matériel provenait de 4 cas de trachome (produits de raclage et d'expression des follicules), d'une culture de corpuscules rickettsoïdes sur le tissu placentaire et d'une culture sur le sac vitellin de l'œuf incubé de poule.

A l'exception d'une expérience manquée à la suite d'une faute de technique (mauvais ajustement du tube dans la bougie), la filtration a réussi dans les cinq autres. Le filtrat dans lequel l'examen direct a lui-même révélé parfois de rares formations intramicrobiennes caractéristiques, fut ensuite soumis à une centrifugation rapide (10.000 t/m) pendant quinze, trente et quarante-cinq minutes.

Dans le culot de centrifugation, on a pu constater la présence de corpuscules rickettsoïdes en grande quantité dans 3 cas et en quantité restreinte dans les 2 autres cas. Il va de soi que toutes les expériences ont été effectuées en observant la stricte stérilité des ustensiles employés et sous contrôle bactériologique rigoureux (frottis, ensemencements à chaque stade de l'expérience).

L'expérience la plus concluante a été celle effectuée avec la suspension d'une membrane vitelline de l'œuf de poule inoculé avec du matériel trachomateux (raclage conjonctival). Examinée au dixième jour après l'inoculation, cette membrane a révélé de nombreuses inclusions et corps élémentaires en présence d'une contamination staphylococcique. Afin d'éliminer cette dernière nous avons appliqué la technique de filtration exposée ci-dessus. Le résultat fut remarquable. Le filtrat obtenu s'est révélé stérile au sens bactériologique et virulent dans l'épreuve sur placenta et sur le sac vitellin neuf. Il a provoqué, neuf jours après l'inoculation dans le jaune d'œuf, une infection intense des cellules avec présence de corps du trachome accompagnés d'inclusions à divers stades d'évolution et absence de bactéries. Le culot du filtrat, centrifugé pendant une demi-heure à 10.000 tours par minute, contenait les corps élémentaires typiques, dont le pouvoir pathogène pour l'homme fut établi dans les conditions analogues par Macchiavello.

**RÉSUMÉ.** — Une technique de filtration simplifiée fut appliquée avec succès aux unités filtrables des corps du trachome sur des bougies de petites dimensions, munies d'un tube relativement haut, dans lequel a été introduite la suspension à filtrer. La filtration s'effectue sous pression du liquide lui-même. Le dispositif est très pratique pour les petites quantités de matériel.

(Institut d'Hygiène du Maroc Rabat.)

# ACTION DU SULFATE D'OXYQUINOLEINE (QUINOSOL) SUR LES SUSPENSIONS DE *SALMONELLA* POUR SÉRO-DIAGNOSTICS

par L. LE MINOR et S. BASTIAT.

Il arrive parfois que les suspensions H de *Salmonella* (cultures de huit heures en bouillon, additionnées de formol à la dose de 5 cm<sup>3</sup> p. 1.000) se contaminent par des champignons. Nous avons recherché si l'action du sulfate d'oxyquinoléine (quinosol), dont l'action antifongique est connue, ne permettrait pas d'éviter cet inconvénient.

1° *Solubilité du quinosol dans le bouillon ordinaire.* — Aux concentrations de 1,5 g. p. 1.000 et au-dessus il persiste dans les tubes un dépôt cristallin. Avec 1 g. p. 1.000 et au-dessous, le bouillon reste absolument clair.

2° *Solubilité du quinosol dans les suspensions O (alcoolisées) et H (formolées).* — A la concentration de 1 p. 1.000 le quinosol donne un trouble intense dans les suspensions formolées. Dans les suspensions alcoolisées, il se produit une auto-agglutination. Ces phénomènes ne se produisent pas si le quinosol y est ajouté à la dose de 2 p. 10.000.

3° *Action propre du quinosol à 1 p. 1.000 sur les suspensions vivantes de Salmonella.* — Des cultures de huit heures sur bouillon et de vingt-quatre heures sur gélose, émulsionnées en eau physiologique, furent additionnées de 1 p. 1.000 de quinosol et titrées vis-à-vis de sérum O et H.

		+ SÉRUM O (2 heures à 37° + 24 heures au laboratoire)	+ SÉRUM H (2 heures à 37°)
<i>S. typhi</i> T418.	Culture 24 heures + alcool.	6.400	0
	Culture 24 heures. + quinosol.	1.600	0
	Culture 8 heures + formol.	1.600	25.600
	Culture 8 heures + quinosol.	1.600	25.600
<i>S. para</i> B var. <i>java</i> .	Culture 24 heures + alcool;	800	0
	Culture 24 heures + quinosol.	400	100
	Culture 8 heures + formol.	0	25.600
	Culture 8 heures + quinosol.	0	25.600

Le quinosol a donc une action comparable à celle du formol. Il ne gêne nullement l'agglutinabilité H et diminue l'agglutinabilité O.

4° Comparaison entre le temps nécessaire pour stériliser une culture de *Salmonella* par le formol à 5 p. 1.000 et le quinosol à 1 p. 1.000.

	FORMOL	QUINOSOL
<i>S. typhi</i> T417 . . . . .	1 heure.	4 heures.
<i>S. para</i> A 495. . . . .	1 heure.	3 heures.
<i>S. para</i> B, var. <i>java</i> . . . . .	2 heures.	8 heures.
<i>S. para</i> C 201. . . . .	2 heures.	8 heures.
<i>S. budapest</i> . . . . .	2 heures.	24 heures.

A des cultures de huit heures sur bouillon ordinaire nous avons ajouté soit du formol (5 p. 1.000) soit du quinosol (1 p. 1.000). Les repiquages sur bouillon et gélose furent faits toutes les heures.

5° Nouveaux titrages comparatifs. — Vingt-quatre heures : Age des cultures sur gélose, suspendues ensuite en eau physiologique.

Huit heures : Age des cultures sur bouillon.

A = + Alcool (technique classique pour préparer les suspensions O).

F = + formol 5 p. 1.000.

Q = + quinosol.

Les agglutinations O (vis-à-vis d'un sérum O) sont lues après deux heures d'étuve + vingt-quatre heures au laboratoire.

Les agglutinations H (vis-à-vis d'un sérum polyvalent O et H) sont lues au bout de deux heures d'étuve.

		24 HEURES A	24 HEURES A + Q 2/10.000	24 HEURES + Q 1/1.000	8 HEURES F	8 HEURES F + Q 2/10.000	8 HEURES + Q 1/1.000	8 HEURES vivant
<i>S. typhi</i> . . {	O . . .	6.400	3.200	800	0	0	0	400
	H . . .	100	100	0	25.600	25.600	25.600	25.600
<i>S. para</i> A. {	O . . .	1.600	800	800	0	0	0	800
	H . . .	1.600	800	1.600	12.800	12.800	12.800	9.600
<i>S. para</i> B. {	O . . .	3.200	1.600	400	0	0	0	200
	H . . .	800	400		9.600	12.800	9.600	3.200
<i>S. para</i> C. {	O . . .	800	400	100	0	0	0	200
	H . . .	0	0	0	12.800	12.800	9.600	6.400

Ce tableau montre que l'action du quinosol est comparable à celle du formol sur des cultures de huit heures. L'agglutinabilité O est inhibée, tandis que l'agglutinabilité H est conservée.

6° Conservation des suspensions. — Nous avons conservé pendant trois mois les tubes de suspensions H, ouverts, sur la table du laboratoire. Au bout de quinze jours 2 des tubes des suspensions formolées étaient spontanément contaminés par des champignons. Aucun des tubes additionnés de quinosol ne l'était. Nous avons alors repiqué ces

champignons sur tous les tubes. Ils se sont abondamment développés seulement dans les tubes ne contenant pas de quinosol.

Au bout de trois mois nous avons refait les titrages vis-à-vis des mêmes sérums. Nous avons retrouvé des titres analogues ou même légèrement supérieurs, et les tubes témoins restaient homogènes.

**RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.** — 1° L'addition de quinosol à la dose de 2 p. 10.000 aux suspensions H préparées suivant la technique classique (culture de huit heures sur bouillon, additionnée de 5 p. 1.000 de formol) n'intervient pas sur l'agglutinabilité ni la stabilité de celles-ci et en empêche la contamination par les champignons.

2° Pour préparer des suspensions H pour séro-diagnostic, il est possible de remplacer l'addition de formol par celle de quinosol à la dose de 1 p. 1.000. Cet antiseptique tue les germes moins rapidement que le formol, mais empêche toute contamination par les champignons.

(Institut Pasteur. Service des Vaccins.)

## VALEUR DU MILIEU DE MOFFET, YOUNG ET STUART POUR LE TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS EN VUE DE LA CULTURE DU GONOCOQUE

par L. et S. LE MINOR et R. COMBES.

Jusqu'à l'an dernier, les milieux de transport permettant de conserver la vitalité du gonocoque dans les prélèvements ne donnaient guère de résultats satisfaisants. Les repiquages devaient être faits dans les six heures, et le transport effectué dans des conditions peu pratiques : 36° pour certains milieux, 0° pour d'autres, neige carbonique, etc. D'autre part, tous ces milieux sont nutritifs, et même avec addition de colorant, tel que le bleu de Nil A, les saprophytes s'y développent.

Le milieu de Moffet, Young et Stuart (1), basé sur un principe différent, constitue un progrès très important. Il n'est pas nutritif et est additionné d'un réducteur : l'acide thioglycolique.

Eau distillée gélosée à 0,3 p. 100. . . . .	490 cm <sup>3</sup>
Acide thioglycolique. . . . .	0,2 cm <sup>3</sup>
Ajuster à pH 7,2 au moyen de NaOH N/1.	

2° Ajouter au mélange ci-dessus :

Glycérophosphate de soude à 20 p. 100 dans l'eau distillée. . . . .	10 cm <sup>3</sup>
CaCl <sub>2</sub> en solution à 1 p. 100. . . . .	2 cm <sup>3</sup>
Ramener à pH 7,4 au moyen de NaOH N/1.	

(1) M. MOFFET, S. L. YOUNG et R. D. STUART, *Brit. med. J.*, 1948, n° 4573, 421.



## 3° Ajouter alors :

Bleu de méthylène à 1 p. 100 (concentration terminale  
 1/500.000) . . . . . 0,04 cm<sup>3</sup>  
 Stériliser à 108° pendant vingt minutes.

Dans ce milieu, le bleu de méthylène sert d'indicateur de potentiel d'oxydo-réduction ; le milieu est incolore, et au cas où il aurait une couleur bleue, il ne doit plus être utilisé.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé le milieu initial. Les prélèvements étaient faits à partir de l'urètre chez l'homme, à partir de l'urètre et du col chez la femme. Nous avons, d'une part, pratiqué un ensemencement direct, et, d'autre part, un second prélèvement fait à l'écouvillon était mis dans un flacon de milieu de transport. Nous avons conservé celui-ci sans précautions spéciales, à la température ambiante. Les repiquages furent faits sur milieu de Peizer et Steffen modifié, suivant la technique déjà indiquée. Dans les résultats ci-dessous, correspondant à des individus dont l'ensemencement direct était positif, nous avons mis en numérateur le nombre d'échecs du repiquage, et en dénominateur le nombre de succès.

1 JOUR	2 JOURS	3 JOURS	4 JOURS
—	—	—	—
0/30	8/42	2/4	2/4

Ce milieu se montrait donc parfaitement satisfaisant, à condition que le repiquage soit fait dans les vingt-quatre heures.

L'obtention d'acide thioglycolique s'avérant difficile, nous avons essayé d'autres réducteurs : la réductose fut utilisée suivant la technique décrite par Prévot pour la culture des anaérobies : une solution à 25 g. p. 1.000 de réductose est stérilisée à 108° pendant vingt minutes. Nous avons remplacé pour 190 cm<sup>3</sup> d'eau gélosée l'acide thioglycolique par 16,75 cm<sup>3</sup> de cette solution de réductose ; cette technique ne nous a pas donné de bons résultats.

Par contre, l'acide ascorbique, à la dose de 4 g. pour 190 cm<sup>3</sup> d'eau gélosée, nous a donné satisfaction. En opérant dans les mêmes conditions que ci-dessus, nous avons obtenu les résultats suivants :

1 JOUR	2 JOURS	3 JOURS	4 JOURS
—	—	—	—
0/23	4/26	2/6	3/4

En conclusion, nous possédons actuellement un milieu de transport dans lequel la viabilité du gonocoque se maintient sans exception pendant vingt-quatre heures. Cette amélioration technique rendra de grands services dans la culture du gonocoque. Si le laboratoire d'analyses n'a pas de boîtes de milieu d'isolement toutes prêtes au moment où il a une culture de gonocoque à faire, le milieu d'isolement lui permet de conserver la viabilité de ce germe dans le prélèvement pendant vingt-quatre heures, temps largement suffisant pour couler les boîtes de Petri et les laisser sécher. D'autre part, cette méthode permet de faire les prélèvements en ville et à la campagne, le transport se faisant sans inconvénient à la température ordinaire.

RÉSUMÉ. — Le milieu de transport de Moffet, Young et Stuart utilisé suivant la formule originale, en y remplaçant l'acide thioglycolique par de l'acide ascorbique permet, sans prendre de précautions spéciales au point de vue température, de conserver la viabilité des gonocoques, dans les prélèvements, pendant vingt-quatre heures au moins.

(Institut Pasteur, Service des Vaccins.)

## ÉTUDE

### DE DIVERSES SOUCHES DE *MICROCOCOCCUS ANTIBIOTICUS*

L. LE MINOR et Y. CHABBERT.

Simultanément, dans deux laboratoires différents de l'Institut Pasteur, nous avons isolé en juin 1948, sur des boîtes de Petri de pyocyanique d'une part, de staphylocoque d'autre part, des cocci Gram positifs fortement inhibiteurs vis-à-vis de nombreux germes Gram positifs et Gram négatifs (souches LM 3 et CH 9). Autour de chaque colonie de ces cocci, la culture était complètement inhibée dans un cercle de 2 à 3 cm. de diamètre.

Le principe antagoniste qui se manifestait nettement sur gélose fut facilement obtenu en cultivant le microscope sur bouillon, à condition que celui-ci soit aéré, soit par agitation, soit par barbotage d'air.

Nous avons alors fait le rapprochement entre ces germes et ceux décrits par Dujardin-Baumetz et Magrassi :

En 1934, Dujardin-Baumetz isolait un germe du genre *Micrococcus* qui, ensemencé, en gélose, inhibait la culture de nombreux germes. Il proposait de lui donner le nom de *Micrococcus antibioticus* (souche DB). En 1945, Magrassi étudia un coccus producteur d'un principe antibactérien qu'il obtenait en milieu liquide par barbotage d'air sous pression (souche MA). Cette substance était produite en milieu contenant au moins 30 p. 100 de bouillon, mais non en milieux synthétiques additionnés de diverses peptones, d'acides aminés, d'hémoglobine. Elle était relativement thermostable, mais inactivée par  $Mn O_2$  avec dégagement de gaz. L'action bactériostatique et bactériolytique était plus marquée sur les germes anaérobies que sur les germes aérobies. Enfin, la substance se montrait toxique pour la souris.

Bormetti et Giunchi, étudiant le mécanisme d'action, identifiaient le principe antibactérien au peroxyde d'hydrogène.

Il nous a paru intéressant de voir si ces différentes souches pouvaient être identifiées comme appartenant à une même espèce microbienne et élaboraient un principe identique, et si la production de celui-ci s'apparentait à celle de peroxyde d'hydrogène par les souches de pneumocoques et de streptocoques, comme l'ont montré les travaux de Gordon et MacLeod, et d'Avery et MacNeil.

ORIGINE DES SOUCHES. — Toutes les souches semblent provenir de l'air. Il nous a été possible d'isoler à de nombreuses reprises des souches

identiques par exposition de boîtes de Petri aux contaminations aériennes.

**BACTÉRIOLOGIE.** — Microcoques Gram positif irréguliers, groupés en amas. Croissance homogène en bouillon ordinaire. Sur gélose Veillon : aérobie, rares colonies en anaérobiose. En gélose, croissance en vingt-quatre heures, petites colonies blanchâtres de taille différente. Dissociation se produisant spontanément et étant sans influence sur la production d'antibiotiques.

Activité biochimique : Sur boîtes de Petri de gélose additionnée de 1 p. 100 de sucre et de bleu de bromothymol, et sur milieu de Hiss : glucose, lévulose, galactose, lactose, maltose, saccharose fermentés en vingt-quatre heures. Glycérol et mannitol en sept jours. Sorbitol et amidon très lentement (quinze jours). Xylose, arabinose, rhamnose, inuline, non fermentés en un mois.

Pouvoir protéolytique : gélatine, lait, sérum coagulé : pas de liquéfaction.

Ne réduit pas le rouge neutre. Pas de  $H_2S$  sur milieu au sous-acétate de plomb.

Pas de production d'indol sur eau peptonée (culture faible). Sur milieu de Clark et Lub, réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer négatives. Pas de croissance sur milieu de Koser-Simmons au citrate.

Gélose sang. Verdissement en quarante-huit heures.

Staphylocoagulase négative.

Catalase : Souche MA négative. Souches DB et CH 9, faiblement positives. Souches LM 3, positive.

Conservation : bonne sur gélose ordinaire (plusieurs mois), sauf pour la souche MA qui nécessite de la gélose au sang.

Résistance à la température : le germe est tué par chauffage de une heure à 70°.

Pouvoir pathogène : contrairement à la souche de Magrassi, nos souches ne sont pas pathogènes pour la souris à la dose de 500 millions injectés par voie sous-cutanée.

**FACTEUR ANTAGONISTE.** — 1° *Titrage.* — Méthode de la cupule en gélose et méthode des dilutions sériées glucose-phénol-sulfone-phthaléine (germe test : staphylocoque souche Tisé (Coll. I. P.).

2° *Production.* — Gélose : diffusion rapide. L'ensemencement simultané d'un germe test et des souches inhibitrices peut donner un cercle atteignant 10-15 mm. entre le bord de la culture et le cercle d'inhibition.

*Milieux liquides. Aération.* — Contrairement à un certain nombre de pneumocoques et de streptocoques du groupe  $\alpha$  pris comme témoins, la substance ne peut être obtenue sans violente aération, soit par agitation, soit par barbotage.

*Milieu.* — Magrassi avait précisé la nécessité de 30 p. 100 de bouillon pour avoir une bonne production. En bouillon ordinaire, nous avons obtenu des taux équivalents à 500 microgrammes de perhydrol par centimètre cube inhibant le germe test au 1/100. Mais une production identique a été obtenue en milieu autolysat de levure (autolysat 10 g., phosphate monopotassique 5 g., NaCl 3 g., eau 1.000, pH 7,4),

puis en milieu synthétique additionné d'extrait de levure riche en facteur V. Nous avons retrouvé pour ces germes le fait montré par Avery qui avait précisé que les extraits lavés de pneumocoques n'étaient capables de produire du peroxyde d'hydrogène qu'en présence d'un activateur contenu dans le bouillon et l'extrait de levure.

3° *Propriétés.* — Le produit antibactérien est détruit à 100° rapidement ; à 80° en une heure, perte de 50 p. 100, stable après une heure à 60°. Stable après une heure de contact à des pH s'étageant de 4,2 à 10,6. Inactivé par  $MnO_2$ , charbon. Concentrable par évaporation. Dialysable à travers la cellophane.

IDENTIFICATION AVEC LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE. — Les filtrats présentent les réactions chimiques et peroxydasiques des peroxydes.

Le titrage chimique des filtrats par l'iodure de K nous a donné des

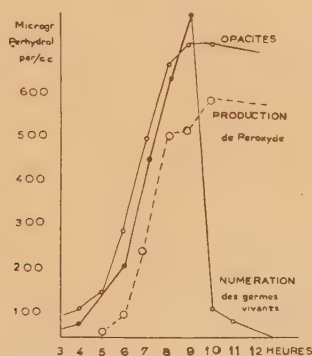


FIG. 1. — Courbe de production de peroxyde en milieu aéré au cours de la croissance (souche  $CH_9$ ).

résultats différant seulement de  $\pm 10$  p. 100 de ceux obtenus par le titrage biologique.

L'action bactériostatique et bactériolytique de filtrats et d'une solution d' $H_2O_2$  titrant 300 microgrammes de perhydrol par centimètre cube sur 18 souches diverses d'Entérobactéries, de *Pseudomonas*, de Staphylocoques, de Streptocoques, nous a montré un parallélisme complet entre l'action de ces deux substances. De plus, les courbes de dosage par la méthode de la cupule, de dilutions de filtrats et d' $H_2O_2$  sont semblables.

ACTION DES FILTRATS DE CATALASE. — Au contact de germes sensibles catalase positifs, il se fait un dégagement d' $O_2$  qui ne se produit plus si la catalase est détruite. L'activité bactériostatique de ces cultures des souches LM 3 et DB disparaît assez rapidement ; elle subsiste au contraire très longtemps avec la souche MA catalase négative. Les cocci producteurs peuvent être lysés par la substance antagoniste. Dans notre technique de production en milieu violemment agité, le peroxyde



d'hydrogène est produit parallèlement à la phase logarithmique de croissance. Le maximum étant atteint en sept heures de culture, à ce moment le taux atteint environ 500 microgrammes de perhydrol par centimètre cube. A la huitième heure, il y a destruction brutale de la presque totalité des germes vivants en une heure, avec légère augmentation du taux (fig. 1). Au bout de quatorze heures, les repiquages sont négatifs. Cependant, ces germes sont relativement résistants à l'action bactériostatique d' $H_2O_2$ . Ils ne sont inhibés que par 150 microgrammes, alors que la souche test l'est par 5 microgrammes.

L'étude de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et la recherche de l'activité catalasique de diverses souches que nous avons faite, se superposent à la classification des germes, basée sur ces facteurs, que McLeod et Gordon avaient proposée en 1923. La souche de Dujardin-Baumetz et les nôtres semblent analogues, tandis que celle de Magrassi s'en écarte par quelques caractères (catalase négative, pouvoir pathogène, conservation nécessaire sur gélose au sang). *Micrococcus antibioticus* rentre dans la catégorie des germes producteurs de peroxyde et peu sensibles à  $H_2O_2$  à côté des pneumocoques et de certains streptocoques, mais l'activité catalasique de certaines souches leur fait une place à part.

(Institut Pasteur.)

#### BIBLIOGRAPHIE

- AVERY et MORGAN. *J. exp. Med.*, 1924, **39**, 275.  
 AVERY et NEILL. *J. exp. Med.*, 1924 **39**, 347.  
 BONETTI et GIUNCHI. *Boll. Ist. Sierot. Milan.*, 1946, **25**, 127.  
 CALLOW. *J. Path. Bact.*, 1923, **26**, 320.  
 DUJARDIN-BAUMETZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **410**, 1210 ; 1934, **447**, 1178 ; 1937, **124**, 890.  
 JAYLE. *Etude biochimique et physiopathologique des peroxydases animales*. Imprimerie Declume, Lons-le-Saunier.  
 MAC LEOD et GORDON. *J. Path. Bact.*, 1922, **25**, 139 ; 1923, **26**, 127 et 136 ; *Biochem. J.*, 1922, **16**, 499.  
 MAC LEOD, GORDON et PYRAM. *J. Path. Bact.*, 1923, **26**, 127.  
 MAC LEOD et GOVENLOCK. *Lancet*, 1921, **1**, 900.  
 MAGRASSI. *Boll. Ist. Sierot. Milan.*, 1944, **28**, 189 ; 1945, **24**, 118 ; *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1945, **20**, 459.  
 MAGRASSI et SPIGA. *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1946, **22**, 1.  
 NEILL et AVERY. *J. exp. Med.*, 1925, **4**, 41.  
 STERN. *J. biol. Chem.*, 1936, **114**, 473.

## ACTION DES ULTRASONS SUR DEUX PROTÉASES GASTRIQUES CRISTALLISÉES

par G. MILHAUD et R.-O. PRUDHOMME.

Freudenberg et Buchs (1) ont montré que le suc gastrique contenait à côté de la pepsine un second ferment protéolytique dont le pH optimum se situait vers 3,3 en utilisant de l'édestine comme substrat. Ce ferment fut nommé la cathepsine gastrique.

Dans la pepsine cristallisée selon Northrop (2), le second ferment est contenu en quantité égale ou légèrement supérieure à celle de la pepsine ; les proportions relatives de ces deux diastases sont conservées par rapport à celles du suc gastrique normal (1).

Nous avons soumis à l'ultrasonation une solution de pepsine cristallisée en déterminant le degré d'inactivation de chaque ferment au cours de l'expérience et nous avons essayé de préciser le mécanisme de l'inactivation.

**PARTIE EXPÉRIMENTALE.** — Le générateur à ultrasons (3) de la Maison S. C. A. M. équipé avec un quartz piézoélectrique de 3 mm. d'épaisseur donne une fréquence ultrasonore de 960 kilocycles avec une puissance émise au niveau du quartz de 6,8 W au centimètre carré, soit une puissance totale de 76 W. Le faisceau ultrasonore se propage dans une cuve cylindrique verticale remplie d'eau courante (la température demeure inférieure à 20°), dans laquelle on plonge une cloche contenant la solution de pepsine (4) à 0,8 p. 1.000 et dont le fond est formé d'une membrane transparente aux ultrasons. Le liquide y est soumis à une vive agitation et à la cavitation quand l'appareil est en marche. Nos expériences ont été effectuées dans l'air puis dans l'hydrogène.

Le dosage de l'activité protéolytique a été réalisé en utilisant une solution d'édestine cristallisée (5) à 5 p. 1.000 comme substrat ; on l'amène aux pH suivants en la dissolvant dans (1) :

HCl	n/5	pH	4,05
	n/15		4,58
	n/33		4,85
	n/50		2,2
Acide acétique	n		2,73
	n/2		2,95
	n/7		3,3
	n/25		3,70
	n/50		4,0

(1) E. FREUDENBERG, *Enzymologia*, 1940, **8**, 385 ; S. BUCHS, *Die Biologie des Magenkathepsins*, 1947, S. KARGER, Bâle, New-York.

(2) J. H. NORTHROP, *Erg. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 302.

(3) R. O. PRUDHOMME et P. GRABAR, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 122.

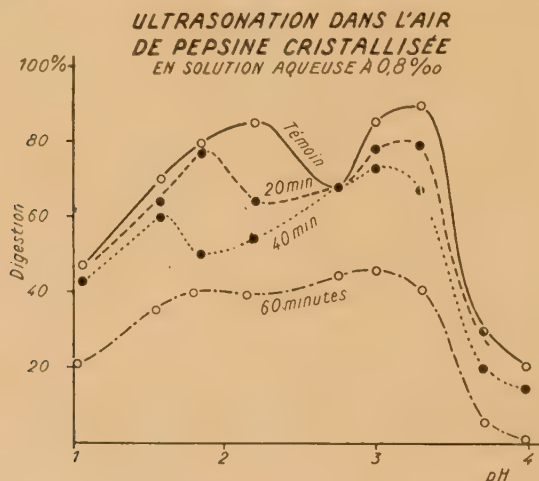
(4) Pepsine cristallisée (Amour and Co).

(5) Edestine Hoffmann-La Roche.

La technique du dosage, qui permet de déterminer le pourcentage de digestion, est rapportée dans la note suivante (6).

Nous avons obtenu les courbes suivantes en fonction du temps, en portant l'activité (pourcentage de digestion) en ordonnées et le pH du substrat en abscisse (figure).

Il ressort de la figure que les ultrasons inactivent les deux ferments gastriques ; le second est cependant plus résistant que la pepsine, ce qui est particulièrement net en considérant la courbe de digestion obtenue après quarante minutes d'ultrasonation. Au cours de cette inactivation le pH optimum se déplace pour les deux protéases du côté



acide, phénomène qui est plus accusé pour la pepsine que pour la cathepsine.

Les ultrasons peuvent avoir une action mécanique et chimique. Il est en effet connu que la cavitation ultrasonore donne lieu par un processus photochimique à la décomposition de l'eau en H et  $-[OH]$  (7). Si on opère en présence d'eau pure il y a formation d'eau oxygénée. Si des substances oxydables sont en solution, c'est sur elles que les radicaux  $-[OH]$  porteront leur action. Il était intéressant de savoir si l'inactivation des deux protéases était due à une action mécanique pure ou à une action chimique. On sait que l'on peut éviter les oxydations des ultrasons par adjonction d'une goutte d'éther à la solution étudiée ou en opérant sous une atmosphère d'hydrogène (8). L'expérience nous a montré que dans ces conditions l'activité des deux enzymes était parfaitement conservée, ce qui donne à croire que l'inactivation des deux protéases par les ultrasons est due vraisemblablement à une oxydation. De plus celle-ci n'est pas liée à la formation d'eau

(6) G. MILHAUD et P. LÉPINE, ces *Annales*, 1949, **77**, 335.

(7) R. O. PRUDHOMME et P. GRABAR, *J. Chimie physique* (sous presse).

(8) R. O. PRUDHOMME et P. GRABAR, ces *Annales*, 1949, **76**, 460.



oxygénée par ultrasonation, puisque l'addition de ce corps à une solution de pepsine ne modifie pas les activités diastasiques. On peut donc admettre que les radicaux  $-(OH)$  sont les agents de cette oxydation qui doit avoir lieu au niveau des noyaux cycliques de la pepsine.

**RÉSUMÉ.** — L'ultrasonation dans l'air des deux ferments protéolytiques contenus dans la pepsine cristallisée s'accompagne d'une inactivation qui est plus rapide pour la pepsine que pour la cathepsine. Cette dénaturation ne se produit pas si l'on opère en présence d'une goutte d'éther ou sous atmosphère d'hydrogène, ce qui semble indiquer qu'elle est le résultat d'une oxydation.

(Service des Fermentations et Service de Chimie microbienne.  
Institut Pasteur.)

## ULTRACENTRIFUGATION DES DEUX PROTEASES GASTRIQUES CRISTALLISÉES

par G. MILHAUD et P. LÉPINE.

Freudenberg et Buchs (1) étudiant la digestion des nourrissons découvrirent dans leurs sucs gastriques un nouveau ferment protéolytique dont le pH optimum se situait aux environs de 3,3 en utilisant l'édestine comme substrat. Une digestion pouvait ainsi s'effectuer là où classiquement elle était impossible du fait du pH trop élevé du milieu. Les activations par les groupes thiols et le cyanure permirent de le classer dans le groupe de la cathepsine décrit par Willstätter (2). contenu en quantité égale ou légèrement supérieure à celle de la pepsine (1).

Nous avons ultracentrifugé une solution de pepsine cristallisée pour tenter de séparer les deux protéases, au cas où la différence de leur taille le permettrait. Nous avons en outre calculé le diamètre de leur particule en utilisant la formule :

$$2r = 7,94 \cdot 10^7 \sqrt{\frac{\eta}{(\sigma_p - \sigma_m)N^2} \cdot \frac{1}{t} \cdot \log \frac{x+h}{x+h\frac{c}{c_0}}} \quad (1)$$

où  $2r$  représente le diamètre de la particule en  $\mu$ .

$\eta$	la viscosité de la solution.
$\sigma_p$	la densité du produit étudié.
$\sigma_m$	la densité du solvant.
$N$	le nombre de tours par minute.
$t$	le temps en minutes.
$h$	la hauteur du prélèvement du liquide surnageant.
$x$	la distance ménisque/axe de rotation.
$c_0$	la concentration de la solution au temps 0.
$c_t$	la concentration de la solution au temps $t$ .

(1) E. FREUDENBERG, *Erg. Enzymologia*, 1940, **8**, 385 ; S. BUCHS, *Biologie des Magenkathepsins*, 1947, S. KARGER, Bâle, New-York.

(2) R. WILLSTAETTER et E. BAMANN, *Z. physiol. Chem.*, 1929, **180**, 127.

Dans la pepsine cristallisée selon Northrop (3), le second ferment est

(3) J. H. NORTHROP, *Erg. Enzymforschg*, 1932, **1**, 302.



PARTIE EXPÉRIMENTALE. — L'ultracentrifugeuse utilisée a été décrite précédemment (4). Nous avons ultracentrifugé une solution de pepsine cristallisée à 8 p. 1.000 dans de l'eau distillée, dont les caractéristiques étaient les suivantes :

$\eta$ . . . . .	10,62.10 <sup>-3</sup>
$\sigma_p$ . . . . .	1,32 (3)
$\sigma_m$ . . . . .	0,9975

Technique du dosage :

Le dosage de l'activité protéolytique (1) a été réalisé en utilisant comme substrat de l'édestine cristallisée (5) à 5 p. 1.000 que l'on dissout à chaud dans :

HCl  $n/50$  ce qui donne le pH 2,2 (optimum de la pepsine).  
 $\text{CH}_3\text{COOH}$   $n/7$  ce qui donne le pH 3,3 (optimum de la cathepsine).

On fait agir 0,1 cm<sup>3</sup> de la solution enzymatique diluée exactement dix fois sur 2,5 cm<sup>3</sup> de substrat pendant dix minutes, à 40°, puis on introduit 0,5 cm<sup>3</sup> de ce mélange dans 4 cm<sup>3</sup> d'une solution de gomme arabique stabilisée à 5 p. 1.000 et exactement cinq secondes après, on ajoute 0,5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfosalicylique à 20 p. 100. La solution de gomme arabique est préparée en chauffant à ébullition, puis filtrée. Elle permet d'obtenir un précipité homogène, dont le trouble est lu au photocolorimètre de Meunier (filtre bleu), que l'on a préalablement étalonné à l'aide de solutions d'édestine de concentrations connues. Le résultat du dosage exprime l'activité enzymatique (p. 100 de digestion).

#### Essai de séparation des deux protéases.

##### Première ultracentrifugation.

$t$ . . . . .	120 minutes.	
$N$ . . . . .	86.400 tours par minute.	
$x$ . . . . .	9,75 mm.	
$h$ . . . . .	7,0 mm.	
$c_0$ . . . . .	Pepsine 80 p. 100	Cathepsine 78 p. 100
$c_t$ . . . . .	63 p. 100	60 p. 100
$\Delta$ . . . . .	17 p. 100	18 p. 100

##### Deuxième ultracentrifugation.

$t$ . . . . .	180 minutes.	
$N$ . . . . .	76.800 tours par minute.	
$x$ . . . . .	9,75 mm.	
$h$ . . . . .	7,0 mm.	
$c_0$ . . . . .	Pepsine 80 p. 100	Cathepsine 84 p. 100
$c_t$ . . . . .	55 p. 100	56 p. 100
$\Delta$ . . . . .	25 p. 100	25 p. 100

On voit que les activités des deux protéases dans le tiers supérieur du liquide surnageant ont diminué d'une quantité que l'on peut considérer comme exactement égale, étant donné la précision du dosage. On ne peut donc séparer de cette façon les deux ferments.

(4) P. LÉPINE, *J. Chimie physique*, 1942, 39, 1.

(5) Edestine crist., Hoffmann-La Roche.

*Calcul de la taille de la particule* (6). — En partant des mêmes éléments, on obtient en utilisant la formule I :

Première ultracentrifugation  $2r = 3,38 \text{ m}\mu$ .

Deuxième ultracentrifugation  $2r = 3,45 \text{ m}\mu$ .

Ces valeurs sont un peu inférieures à celles que Northrop (3) avait déterminées en utilisant la méthode de diffusion ( $2r = 4,4 \text{ m}\mu$ ) ; elles sont néanmoins comprises dans l'ordre d'erreur de la technique que nous avons employée.

**RÉSUMÉ.** — L'ultracentrifugation d'une solution de pepsine cristallisée contenant en quantité sensiblement égale une seconde protéase, la cathepsine, ne permet pas de séparer ces deux ferments, du moins dans les conditions où nous nous sommes placés.

Les dimensions de la particule sont de l'ordre de  $3,4 \text{ m}\mu$ .

Il s'agit donc soit de deux ferments ayant une masse voisine soit, comme d'autres expériences semblent le confirmer, d'un seul ferment à activité double.

(Service des Fermentations et Service des Virus, Institut Pasteur.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Microcultures sur lames du bacille de Koch dans le sang humain. Utilisation du sang conservé pour déterminer la streptomycino-résistance**, par ET. BERNARD et B. KREIS.

**Sur un nouveau procédé d'obtention des leucocytes à partir du sang circulant**, par R. ROBINEAUX et M<sup>me</sup> J. LEBRUN.

**Modes d'examen de lymphocytes *in vitro*: colorations vitales, étude des pycnoses**, par M<sup>me</sup> J. LEBRUN.

**Différenciation du tissu nerveux en culture sur membranes plastiques**, par P. W. WEI et G. BARSKI.

**Remarques sur le mode d'activité des sulfones combinées. I. Activité *in vitro***, par F. BOYER, N. RIST et M. SAVIARD.

**Effet du pH dans l'action des acides gras sur la croissance microbienne**, par D. DERVICHIAN et H. MOUSSET.

(6) Nous avons admis en première approximation que l'activité enzymatique était proportionnelle à la concentration en ferment. Ce faisant, on commet une erreur inférieure à 5 p. 100.

Le Gérant : G. MASSON,



